GABRIELA HASE SIQUEIRA

**ENVOLVIMENTO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE *Leptospira interrogans*
NOS MECANISMOS DE EVASÃO E INVASÃO DO HOSPEDEIRO**

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

São Paulo
2014

GABRIELA HASE SIQUEIRA

**Envolvimento de proteínas de membrana de *Leptospira interrogans* nos
mecanismos de evasão e invasão do hospedeiro**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Tabet
Oller do Nascimento

Versão original

São Paulo
2014

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

© reprodução total

Siqueira, Gabriela Hase.

Envolvimento de proteínas de membrana de *Leptospira interrogans* nos mecanismos de evasão e invasão do hospedeiro / Gabriela Hase Siqueira. -- São Paulo, 2014.

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

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Vacinas recombinantes e patogenicidade bacteriana.

Versão do título para o inglês: Involvement of *Leptospira interrogans* membrane proteins in evasion and invasion mechanisms of the host.

1. Leptospira 2. Leptospirose 3. Proteínas recombinantes 4. Mecanismos de patogenicidade I. Nascimento, Profa. Dra. Ana Lucia Tabet Oller do II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB065/2014

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

Candidato(a): Gabriela Hase Siqueira.

Título da Tese: Envolvimento de proteínas de membrana de *Leptospira interrogans* nos mecanismos de evasão e invasão do hospedeiro .

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

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo de duas proteínas de membrana de *Leptospira interrogans* expressas no hospedeiro *Escherichia coli*", protocolo nº 768/10, sob a responsabilidade de Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento e Gabriela Hase Siqueira - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/03/2013.

Vigência do Projeto: 09/2010 - 07/2015	Nº de animais/espécie	Aditivo/Observação
Centro de Biotecnologia	125 camundongos Balb/c (F); 30 hamsters Golden (F)	Alteração de vigência

São Paulo, 18 de março de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

**Aos meu pais que amo tanto, Lore e
Almir, e ao meu grande companheiro,
João Victor. Sem o apoio de vocês
esse trabalho jamais chegaria ao fim.
Muito Obrigada!!!**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus, pela força que sempre me deu e pelas pessoas que colocou em meu caminho tornando toda essa trajetória mais agradável.

Em seguida, agradeço aos meus amados pais, Lore e Almir, pelo amor, dedicação e apoio em todos os momentos. Ao meu companheiro de todas as horas, João Victor, obrigada pelo incentivo e pelo apoio incondicional. Agradeço também ao meu querido tio Álvaro que sempre está na torcida pelo meu sucesso.

À minha orientadora, Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento, um agradecimento especial por abrir as portas de seu laboratório e em algum momento acreditar no meu trabalho.

À minha coorientadora e amiga, Dra. Marina von Atzingen dos Reis, por me ensinar a dar os primeiros passos na vida acadêmica e por todo o conhecimento concedido que jamais serão esquecidos.

À minha amiga Aline Teles de Barros, por acreditar no meu potencial como profissional e me indicar para a Dra. Ana Lúcia, dando início a essa trajetória.

Aos colegas do laboratório, uns já seguindo outro caminho outros recém-chegados, mas sempre tornando o dia a dia prazeroso, com muita descontração e trocas de conhecimento: Mônica, Renata, Renan, Natalie, Luís, Aline, Raquel, Lucas, Jupciana, Marília e Camila. Em especial, às duas grandes amigas que levo no coração, Ivy e Rosane, pelos momentos de desabafo e consolo, pelas risadas e pela amizade sincera. À Rosane, agradeço ainda pela grande troca de conhecimento e pelas críticas e sugestões durante a confecção dessa tese.

Ao Dr. Silvio A. Vasconcellos, Gisele O. Souza e Zenaide M. de Moraes, do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pela manutenção de culturas de leptospiros e pela colaboração nos ensaios de desafio.

À Dra. Eliete C. Romero, do Instituto Adolfo Lutz Central, por ceder os soros de pacientes diagnosticados com leptospirose.

À Dra. Toshie Kawano (em memória), Alexsander S. Souza e Henrique Krambeck Roffato, do Departamento de Parasitologia do Instituto Butantan, não só por auxiliar no uso do microscópio confocal, mas também pelas sugestões que foram sempre de grande valia. Ao Henrique Krambeck Roffato agradeço ainda, junto com a Tereza C. Barbosa, pelo auxílio na aplicação da técnica de real time PCR.

À colega Keyde Cristina Martins e sua orientadora Dra. Rita Ruiz, por auxiliarem com alguns cálculos estatísticos.

Aos professores da disciplina de Microbiologia Básica para Enfermagem, do Instituto de Ciências Biomédicas II, e ao colega Rodrigo, por me ensinarem o amor pela docência.

À todos do Instituto Butantan, em especial ao Centro de Biotecnologia, e aos coordenadores e professores do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, que contribuíram para a minha formação acadêmica.

À FAPESP, CAPES, CNPq e Fundação Butantan, pelo suporte financeiro.

Muito Obrigada!!!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser... mas graças a Deus,
não sou o que era antes.”*

Martin Luther King Jr.

RESUMO

SIQUEIRA, G. H. **Envolvimento de proteínas de membrana de *Leptospira interrogans* nos mecanismos de evasão e invasão do hospedeiro.** 2014. 263 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Leptospirose é uma zoonose bacteriana de distribuição mundial que acarreta em grandes prejuízos econômicos e sociais. Anualmente são relatados aproximadamente 100.000 casos em todo o mundo. O agente etiológico dessa doença são bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Animais portadores assintomáticos eliminam constantemente as leptospirosas vivas pela urina que podem contaminar solo e água e infectar o homem. A leptospirose humana possui um quadro clínico variado, sendo a manifestação mais severa caracterizada por icterícia e hemorragias que muitas vezes levam ao óbito. Medidas de controle e prevenção para essa doença são difíceis de serem implementadas, tornando crítico o desenvolvimento de uma vacina. No entanto, mesmo com os avanços alcançados pela biologia molecular, os mecanismos de patogenicidade da leptospira ainda não estão completamente elucidados. Considerando esse como o “primeiro passo” para a elaboração de produtos biotecnológicos eficazes, o presente trabalho selecionou três proteínas hipotéticas (LIC11009, LIC11360 e LIC11975) de *L. interrogans* para serem caracterizadas quanto ao seu papel na patogênese da leptospirose. Os genes foram selecionados com base na sua localização celular predita e amplificados por PCR utilizando o DNA da *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Os amplicons foram clonados no vetor de expressão pAE e expressos em *Escherichia coli*. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade ao metal e a sua integridade estrutural foi avaliada por dicroísmo circular. Estudos utilizando RT-qPCR demonstraram a transcrição dos genes em diferentes sorovares patogênicos de leptospira. Immunoblotting evidenciou a expressão da LIC11009 nativa. Immunofluorescência e proteólise com proteinase K demonstraram a exposição das proteínas na superfície das bactérias. As proteínas rLIC11009, rLIC11360 e rLIC11975 foram reconhecidas por soros de humanos e de hamsters infectados com leptospira sugerindo que essas proteínas são expressas durante a infecção. A avaliação da atividade imunogênica das proteínas recombinantes em camundongos demonstrou que a rLIC11009 é capaz de induzir somente resposta imune Th1, enquanto que rLIC11360 e rLIC11975 são capazes de induzir resposta Th1 e Th2. A imunização de hamsters com rLIC11009 ou rLIC11360 não exerceu efeito imunoprotetor após desafio letal com leptospirosas virulentas. Ensaio de adesão com componentes da matriz extracelular (MEC) mostraram que as proteínas rLIC11009, rLIC11360 e rLIC11975 são capazes de interagir com a laminina de maneira dose-dependente e saturável e por isso foram nomeadas, respectivamente, Lsa26, Lsa23 e Lsa36 (*Leptospiral Surface Adhesin* seguido de suas respectivas massas moleculares). As três proteínas foram capazes de interagir com o plasminogênio e gerar plasmina ativa. As proteínas recombinantes Lsa23 e Lsa36 também interagiram de maneira dose-dependente com a porção N-terminal de 30 kDa da fibronectina plasmática e com o fibrinogênio. A Lsa36 ligada ao fibrinogênio inibiu parcialmente a formação de fibrina. Lsa23 mostrou ter um amplo papel multifuncional, interagindo ainda com os reguladores do sistema complemento fator

H e C4BP, que mantiveram sua atividade de cofator para o fator I. Em conjunto, esses resultados sugerem que as proteínas Lsa26, Lsa23 e Lsa36 podem estar auxiliando a leptospira a evadir, invadir e colonizar o hospedeiro.

Palavras-chave: Leptospirose. *Leptospira*. Proteínas recombinantes. Patogenia. Mecanismos de patogenicidade.

ABSTRACT

SIQUEIRA, G. H. **Involvement of *Leptospira interrogans* membrane proteins in evasion and invasion mechanisms of the host.** 2014. 263 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Leptospirosis is a worldwide bacterial zoonosis that results in large economic and social losses. Hundred thousand cases of leptospirosis are reported each year around the world. The etiologic agent of this disease is a pathogenic bacterium of the genus *Leptospira*. Animal carriers constantly eliminate live leptospires in their urine contaminating soil and water. Human leptospirosis presents wide-ranging of clinical symptoms. Jaundice and severe bleeding that often lead to death, characterize the most severe manifestation. Prevention and control measures for this disease are difficult to implement, making critical the development of a vaccine. However, even with the molecular biology advances, the pathogenic mechanisms of leptospira are still not fully understood. Considering this as the first step toward developing effective biotechnological products, this work selected three hypothetical membrane proteins (LIC11009, LIC11360 and LIC11975) of *L. interrogans* to be characterized for their possible role in the leptospiral pathogenesis. Genes were selected based on their predicted cellular localization and amplified by PCR using DNA from *L. interrogans* serovar Copenhageni. The amplicons were cloned into the expression vector pAE and expressed in *Escherichia coli*. The recombinant proteins were purified by metal affinity chromatography and structural integrity was confirmed by circular dichroism. Studies using RT-qPCR have shown genes transcription in pathogenic leptospira serovars. Immunoblotting has revealed the expression of native LIC11009. Immunofluorescence and proteolysis by proteinase K have shown that these proteins are surface-exposed. The rLIC11009, rLIC11360 and rLIC11975 proteins were recognized by confirmed human leptospirosis serum samples and from experimentally infected hamsters suggesting that these proteins are expressed during the infection. The evaluation of the immunogenic activity of the recombinant proteins in mice has shown that rLIC11009 is able to induce only Th1, whereas rLIC11360 and rLIC11975 are capable of inducing Th1 and Th2 immune responses. Immunization with rLIC11009 or rLIC11360 does not protect hamsters against lethal challenge with virulent leptospires. Adhesion assays with extracellular matrix (ECM) components have shown that rLIC11009, rLIC11360 and rLIC11975 proteins are able to interact with laminin in a dose - dependent and saturable manner and so they were named, respectively, Lsa26, Lsa23 and Lsa36 (Leptospiral Surface Adhesin, followed by their respective molecular masses). All the three proteins were able to interact with plasminogen and generate active plasmin. The recombinant proteins Lsa23 and Lsa36 also interacted in a dose-dependent manner with the 30 kDa N-terminal plasma fibronectin portion and fibrinogen. The binding of Lsa36 to fibrinogen partially inhibited the formation of fibrin. Moreover, Lsa23 is capable of interacting with the complement regulators factor H and C4BP, a binding that kept their cofactor activity for factor I. Taken together, these results suggest that Lsa26, Lsa23 and Lsa36 may participate in leptospiral immune evasion, invasion and colonization of the host.

Keywords: Leptospirosis. *Leptospira*. Recombinant proteins. Pathogenesis. Pathogenicity mechanisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação taxonômica de espiroquetas de importância médica.....	26
Figura 2 – Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy e suas características	50
Figura 3 – Mapa do vetor de expressão em <i>E. coli</i> pAE e suas características	51
Figura 4 – Filograma das sequências de aminoácidos codificadas pelos genes LIC11009, LIC11360, LIC11975, LIC13011 e LIC13477	81
Figura 5 – Fragmentos de DNA obtidos por PCR.....	83
Figura 6 – Liberação de inserto do vetor de expressão pAE após digestão com enzimas de restrição	85
Figura 7 – Análise da expressão das proteínas recombinantes em cepas de <i>E. coli</i>	87
Figura 8 – Análise e confirmação da expressão das proteínas recombinantes.....	88
Figura 9 – Estimativa da concentração das proteínas recombinantes purificadas ...	90
Figura 10 – Espectroscopia circular associada aos vários tipos de estruturas secundárias	91
Figura 11 – Espectros de dicroísmo circular das proteínas recombinantes purificadas	92
Figura 12 – Títulos de IgG dos soros de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes.....	93
Figura 13 – Reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos gerados a partir da imunização de camundongos.....	94
Figura 14 – Estímulo da proliferação <i>in vitro</i> de esplenócitos extraídos de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes	96
Figura 15 – Liberação de citocinas por esplenócitos de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes após estímulo <i>in vitro</i>	99
Figura 16 – Amplificação de sequências correspondentes aos genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 em diferentes sorovares de <i>Leptospira</i>	101
Figura 17 – Níveis de expressão do gene ribossomal 16S em dez sorovares de leptospira.....	103
Figura 18 - Expressão dos genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 em diferentes sorovares de leptospira	105
Figura 19 – Expressão dos genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 em leptospiras mantidas em diferentes condições de cultivo	107

Figura 20 – Expressão dos genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 em cepas virulentas de leptospira	108
Figura 21 – Expressão da proteína LIC11009 em diferentes sorovares de <i>Leptospira</i>	109
Figura 22 – Reatividade das proteínas recombinantes com soros de humanos (A) e de hamsters (B) infectados com leptospira	111
Figura 23 – Efeito sinérgico das proteínas rLIC11009 e rLIC11360 na reatividade com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose	112
Figura 24 – Digestão de proteínas de superfície com proteinase K	114
Figura 25 – Localização das proteínas LIC11009, LIC11360 e LIC11975 por imunofluorescência	115
Figura 26 – Adesão das proteínas recombinantes aos componentes da MEC	117
Figura 27 – Especificidade da adesão das proteínas recombinantes à laminina ...	118
Figura 28 – Ligação das proteínas recombinantes com a laminina após bloqueio com antissoro policlonal (A) ou desnaturação (B)	120
Figura 29 – Envolvimento dos resíduos de açúcar da laminina na sua interação com as proteínas recombinantes	121
Figura 30 - Interação das proteínas recombinantes com componentes do plasma humano	124
Figura 31 - Especificidade da interação das proteínas recombinantes com componentes do plasma humano	126
Figura 32 – Interação dose-dependente da Lsa23 com o fator H.....	127
Figura 33 – Interação das proteínas recombinantes com componentes do plasma humano após bloqueio com antissoro policlonal ou desnaturação	129
Figura 34 – Participação dos carboidratos das glicoproteínas plasmáticas na interação com as proteínas Lsa23 (A) e Lsa36 (B)	130
Figura 35 – Avaliação do papel dos resíduos de lisina das proteínas recombinantes na interação com o plasminogênio.....	131
Figura 36 – Interação das proteínas Lsa23 e Lsa36 com o fragmento N-terminal da fibronectina plasmática.....	133
Figura 37 – Avaliação da competição entre a heparina sódica e as proteínas pela interação com os fragmentos de 70 e 30 kDa da fibronectina plasmática	134
Figura 38 – Conversão do plasminogênio ligado às proteínas recombinantes em plasmina.....	136

Figura 39 – Inibição da formação de fibrina pela proteína Lsa36 ligada ao fibrinogênio.....	138
Figura 40 – Ligação do fator H e C4BP em sítios diferentes da proteína Lsa23	140
Figura 41 – Atividade de cofator do fator H e do C4BP ligados à Lsa23.....	141
Figura 42 – Inibição da interação da <i>L. interrogans</i> com componentes da MEC e do plasma humano pelas proteínas recombinantes	143
Figura 43 – Curva de sobrevivência de hamsters imunizados com Lsa26.....	146
Figura 44 – Curva de sobrevivência dos hamsters imunizados com Lsa23	147

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais candidatos vacinais avaliados experimentalmente	39
Quadro 2 – Fatores de virulência definidos geneticamente para leptospira	47
Quadro 3 – Sequências de oligonucleotídeos sintetizados a partir do genoma de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	53
Quadro 4 – Condições ótimas de cultivo para diferentes linhagens de <i>E. coli</i>	57
Quadro 5 – Sequências de oligonucleotídeos sintetizados para avaliação da expressão gênica	66
Quadro 6 – Resumo da análise <i>in silico</i> das proteínas recombinantes	86
Quadro 7 – Constante de Dissociação (K_D) para a adesão das proteínas recombinantes com a laminina.....	119
Quadro 8 - Constante de Dissociação (K_D) para a ligação das proteínas recombinantes com componentes do plasma humano	134
Quadro 9 – Média dos títulos dos antissoros de hamsters imunizados com Lsa26 e Lsa23	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das características preditas por análise de bioinformática para os genes em estudo	79
Tabela 2 – Análise dos espectros de CD pelo programa K2D3	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs - absorbância

ACA – ácido aminocaproico

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida

Amp – ampicilina

Anvisa – agência nacional de vigilância sanitária

BrdU – bromodesoxiuridina

BSA – albumina do soro bovino

C4BP – C4 *binding protein*

CAM – *cell adhesion molecules*

CD – dicroísmo circular

CDC – *center for disease control and prevention*

cDNA – DNA complementar

Clor - cloranfenicol

ConA – concanavalina A

C_T – ciclo *threshold*

ddNTP – didesoxirribonucleotídeo

DEPC – dietilpirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxirribonucleotídeo

DO – densidade óptica

DPP - *dual path platform*

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

ELISA - *enzyme linked immunosorbent assay*

EMJH – Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris

Fiocruz – fundação Oswaldo Cruz

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FH – fator H

IF – imunofluorescência

IFN – interferon

IL- interleucina

IP – iodeto de propídeo

IPTG - isopropil- β -tiogalactopiranosídeo

JH - Jarisch-Herxheimer
LB – meio Luria Bertani
Len – *leptospiral endostatin-like*
LIC – *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni
Lig – *leptospiral immunoglobulin-like*
LPHS - síndrome hemorrágica pulmonar associada à leptospirose
LPS – lipopolissacarídeo
Lsa – *leptospiral surface adhesin*
MAT – teste de microaglutinação
MEC – matriz extracelular
NTC – *no template control*
OMP – proteína de membrana externa
OMS – organização mundial de saúde
OPD - cloridrato de o-fenilenodiamina
PBS – fosfato salina
PBS *ls* – PBS *low salt*
PBS-T – fosfato salina contendo 0,05% Tween 20
PBS-T/Leite - fosfato salina contendo 0,05% Tween 20 e 10% leite desnatado
PCR – reação em cadeia da polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
PK – proteinase K
PLG – plasminogênio
PMSF – fenilmetilsulfonylfluor
RNA – ácido ribonucleico
rpm – rotações por minuto
RPMI - meio *Roswell Park Memorial Institute*
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
RT-qPCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa
SDS - dodecil sulfato de sódio
SVS – secretaria de vigilância em saúde
TA – temperatura de anelamento
TAE – tris-acetato EDTA
Tm – temperatura de *melting*
TNF – fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Biologia das leptospiros	24
1.2 Taxonomia	26
1.3 Leptospirose	27
1.3.1 Epidemiologia e transmissão	28
1.3.2 Aspectos clínicos	31
1.3.3 Diagnóstico laboratorial	33
1.3.4 Profilaxia e tratamento	36
1.4 Patogenia e fatores de virulência	41
2 MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.1 Bactérias	49
2.1.1 <i>Leptospira</i> spp.	49
2.1.2 <i>Escherichia coli</i>	49
2.2 Vetores de clonagem e expressão	50
2.3 Soros	51
2.4 Análises de bioinformática	51
2.5 Desenho dos oligonucleotídeos	52
2.6 Extração de DNA de culturas de <i>Leptospira</i> spp.	53
2.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	54
2.8 Clonagem	54
2.9 Sequenciamento automático	56
2.10 Teste de expressão das proteínas recombinantes	56
2.11 Immunoblotting para detecção de resíduos de histidina	57
2.12 Purificação e diálise das proteínas recombinantes	58
2.13 Dicroísmo circular (CD)	60
2.14 Imunização de camundongos	60
2.15 Ensaio de linfoproliferação e liberação de citocinas	61
2.16 Detecção de imunoglobulinas	62
2.16.1 ELISA para detectar IgG em soros de camundongos	62
2.16.2 ELISA para detectar IgG em soros de humanos e de hamsters	62
2.16.3 Immunoblotting para detectar IgG em soros de camundongos	63
2.17 Estudos de expressão e localização celular	64

2.17.1 Extração de RNA e transcrição reversa (RT-PCR)	64
2.17.2 Real time RT-PCR (RT-qPCR)	65
2.17.3 Imunoblotting para detecção de proteínas	67
2.17.4 Ensaio de digestão com proteinase K (PK)	68
2.17.5 Imunofluorescência (IF)	69
2.18 Ensaio de interação das proteínas recombinantes com componentes do plasma e da MEC	70
2.19 Curvas de dose-resposta	71
2.20 Ensaio de interação das proteínas recombinantes desnaturadas com componentes da MEC e do plasma humano	71
2.21 Bloqueio da interação proteína-MEC/plasma humano por antissoro contra proteína recombinante	72
2.22 Tratamento de glicoproteínas com metaperiodato de sódio	72
2.23 Competição entre heparina e proteína recombinante na interação com fragmentos proteolíticos da fibronectina plasmática	73
2.24 Competição entre proteína recombinante e ácido aminocaproico (ACA) na interação com o PLG	73
2.25 Conversão do PLG em plasmina	73
2.26 Inibição da catálise do fibrinogênio em fibrina	74
2.27 Competição entre fator H e C4BP pela rLIC11360	74
2.28 Atividade de cofator do C4BP e do fator H	75
2.29 Ensaio de inibição da interação das leptospiros vivas aos componentes da MEC e do plasma humano pelas proteínas recombinantes	75
2.30 Ensaio de imunoproteção	76
2.30.1 Cálculo da DL_{50} (dose letal)	76
2.30.2 Preparo da bactéria	76
2.30.3 Desafio	76
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1 Seleção por bioinformática dos genes a serem estudados	78
3.2 Clonagem dos genes selecionados para estudo	83
3.3 Avaliação da expressão das proteínas recombinantes	85
3.4 Purificação das proteínas recombinantes expressas	88
3.5 Análise da estrutura secundária das proteínas recombinantes purificadas	90

3.6 Avaliação da atividade imunogênica das proteínas recombinantes em camundongos	92
3.7 Avaliação da expressão e localização das proteínas nativas na <i>Leptospira</i>.....	100
3.7.1 Avaliação da presença dos genes e de seus transcritos em dez sorovares de leptospira	100
3.7.2 Distribuição das proteínas nativas em dez sorovares de leptospira	108
3.7.3 Expressão das proteínas em estudo durante a infecção	110
3.7.4 Expressão das proteínas LIC11009, LIC11360 e LIC11975 na superfície da leptospira	112
3.8 Adesão das proteínas recombinantes aos componentes da MEC	116
3.9 Interação das proteínas recombinantes com componentes do plasma humano	121
3.10 Ativação do PLG ligado às proteínas recombinantes em plasmina	135
3.11 Inibição da formação de fibrina pela Lsa36 ligada ao fibrinogênio	136
3.12 Retenção da atividade de cofator do fator H e do C4BP ligados à Lsa23	138
3.13 Inibição da ligação das leptospiros aos componentes da MEC e do plasma pelas proteínas recombinantes	142
3.14 Avaliação do efeito imunoprotetor das proteínas Lsa26 e Lsa23 em hamsters	144
4 CONCLUSÃO	149
REFERÊNCIAS	151
APÊNDICES	171
APÊNDICE A – Cromatogramas do início dos sequenciamentos das construções dos genes no vetor pAE	171
APÊNDICE B – Otimização da concentração de oligonucleotídeos para utilização na RT-qPCR	173
APÊNDICE C – Validação do método $\Delta\Delta C_T$ para quantificação relativa da expressão gênica	175
APÊNDICE D - Curvas de dissociação após as reações de RT-qPCR.....	176
APÊNDICE E – SIQUEIRA, G. H. et al. Characterizaion of three novel adhesins of <i>Leptospira interrogans</i>. <i>Am. J. Trop. Med, Hyg.</i>, v. 89, n. 6, p. 1103-1116, 2013.....	185

APÊNDICE F – OLIVEIRA, R. et al. Adhesins of <i>Leptospira interrogans</i> mediate the interaction to fibrinogen and inhibit fibrin clot formation <i>in vitro</i> . PloS. Negl. Trop. Dis. , v. 7, n. 8, p. e2396, 2013.	199
APÊNDICE G – VIEIRA, M. L. et al. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. FEMS Microbiol. Lett. , v. 352, n. 2, p. 129-139, 2014.	213
APÊNDICE H – DOMINGOS, R. F. et al. Mapeamento de genomas bacterianos: sequenciamento e funcional de leptospiros. Biotecnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e Aplicações , Editores: Rodrigo Resende e Carlos Ricardo Soccol, Ed. Blucher S/A. Capítulo de livro em revisão.....	224
APÊNDICE I – ATZINGEN, M. V. et al. Induction of boosted immune response in mice by leptospiral surface proteins expressed in fusion with DnaK. BioMed Research Intern. Manuscrito submetido.	247

1 INTRODUÇÃO

Leptospiras são bactérias que pertencem à ordem *Spirochaetales*, um grupo de organismos distintos que engloba diversos patógenos de importância médica, como o agente da doença de Lyme e da sífilis. Há 100 anos, Wolbach e Binger descreveram a leptospira, pela primeira vez, em preparações de águas provenientes de lagoas. Nos anos seguintes, Inada e colaboradores descreveram essa bactéria como o agente etiológico da leptospirose (FAINE et al., 1999). O gênero *Leptospira* é composto tanto por espécies patogênicas como de vida livre. A capacidade de se adaptar a diversos ambientes e hospedeiros mostra o quanto as leptospiras são peculiares; o sequenciamento genômico nos anos 2000 identificou que aproximadamente 78% dos genes que codificam proteínas exclusivas para *L. interrogans* são codificantes para proteínas com função desconhecida (ADLER et al., 2011), corroborando com a ideia de que essas bactérias possuem uma biologia única.

1.1 Biologia das leptospiras

Bactérias do gênero *Leptospira* são espiroquetas finas e rijamente enroladas de maneira espiralada que medem aproximadamente 0,1 µm de diâmetro e 6-20 µm de comprimento, dependendo das condições de cultivo (LEVETT, 2001). Possuem uma ou duas extremidades geralmente dobradas em gancho, sendo que variantes patogênicas alongadas podem ocorrer principalmente quando atenuadas em culturas *in vitro*. Por serem tão finas só podem ser visualizadas por microscopia de campo escuro ou contraste de fase. São dificilmente coradas pela técnica de Gram, mas podem ser impregnadas por prata pelo método de Fontana-Tribondeau (FAINE et al., 1999).

Leptospiras possuem uma superfície semelhante à de bactérias Gram-negativas, com uma estrutura de dupla membrana e elevada quantidade de lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa, componente ausente em todas as outras espiroquetas (HAAKE; MATSUNAGA, 2010). Por outro lado, a sua camada de peptidoglicano está intimamente associada à membrana citoplasmática, característica comum às bactérias Gram-positivas. Os LPSs de leptospiras são estruturalmente e quimicamente semelhantes aos de outras bactérias Gram-

negativas, no entanto possuem uma toxicidade menor para as células ou animais, sendo 12 vezes menos letal para camundongos do que o LPS de *E. coli* (ISOGAI et al., 1986; VINH; ADLER; FAINE, 1986). Características singulares do lipídeo A de leptospira, como a fosforilação e metilação do dissacarídeo de glucosamina (QUEGEWIRTH et al., 2004), podem ser responsáveis pela sua atividade endotóxica reduzida. Além do LPS, a membrana externa das leptospiros possui uma grande diversidade de proteínas de transmembrana e, assim como a de *Borrelia* spp., é rica em lipoproteínas (HAAKE; MATSUNAGA, 2010).

No espaço periplasmático estão localizados dois endoflagelos que se inserem em cada polo da célula e se estendem em direção à extremidade oposta, terminando no centro da mesma. Os flagelos periplasmáticos conferem mobilidade e forma às leptospiros, embora a camada de peptidoglicano pareça ser mais importante para a forma espiralada das leptospiros do que para as outras espiroquetas (PICARDEAU; BRENOT; SAINT GIRONS, 2001; WOLGEMUTH et al., 2006).

As leptospiros são bactérias aeróbias obrigatórias com crescimento ótimo em temperaturas entre 28 e 30 °C e pH entre 7,2 e 7,6. Possuem um crescimento lento, com tempo de geração em torno de 6-8 horas. No isolamento primário as cepas patogênicas são mais fastidiosas, com tempo de geração em torno de 14-18 horas, e por isso os cultivos são mantidos por cerca de 13 semanas. Espécies saprofíticas possuem um crescimento mais rápido, com tempo de geração de aproximadamente 5 horas (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Nutricionalmente pouco exigentes, crescem em meio simples enriquecido com vitaminas B1 e B12, ácidos graxos de cadeia longa e sais de amônio. O meio mais utilizado para cultivo *in vitro* dessas bactérias é o Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris (EMJH) que contém albumina sérica bovina como detoxificante e ácido oleico complexado à polissorbato como fonte de carbono. Os ácidos graxos de cadeia longa são utilizados como única fonte de carbono e são metabolizados principalmente por β -oxidação, embora conjuntos de genes completos do metabolismo do glicerol e da via de utilização da glicose tenham sido identificados em seu genoma (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; NASCIMENTO et al., 2004a).

No ambiente natural as leptospiros conseguem sobreviver em solos úmidos, lamas, pântanos, córregos e rios por longos períodos, principalmente quando o pH é ligeiramente alcalino, não resistindo aos ambientes secos. Trueba et al. (2004)

relataram a sobrevivência de leptospiros patogênicos mantidas *in vitro* em água destilada por 110 dias. A formação de biofilme por leptospiros deve ser um dos mecanismos de sobrevivência utilizado por essas bactérias (RISTOW et al., 2008). Como exceção se encontra a *L. borgpetersenii* que não consegue sobreviver fora do seu hospedeiro; análises demonstraram uma redução de 700 kb no seu genoma com a perda de genes envolvidos na sobrevivência no meio ambiente e no transporte e utilização de metabólitos, o que limitou sua transmissão ao contato direto hospedeiro-hospedeiro (BULACH et al., 2006).

1.2 Taxonomia

As leptospiros são bactérias que compõem a ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae* (Figura 1). O gênero *Leptospira* foi designado principalmente com base nas suas características morfológicas e de cultivo. Entretanto, morfolologicamente todas as leptospiros são muito semelhantes e por isso não podem ser diferenciadas microscopicamente com base nos critérios fenotípicos utilizados comumente em classificações bacterianas (FAINE et al., 1999).

Figura 1 – Classificação taxonômica de espiroquetas de importância médica

Até a década de 80 todas leptospiros eram agrupadas em dois grandes complexos, de acordo com sua capacidade em causar ou não leptospirose,

“interrogans” e “biflexa” respectivamente. Em seguida esses complexos passaram a ser reconhecidos como espécies distintas por conta de algumas características fenotípicas. *L. biflexa* não apresenta forma esférica em presença de 1 M NaCl e pode ser cultivada a 13 °C na presença de 8-azaguanina, enquanto que *L. interrogans* não (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Desde que os bacteriologistas observaram que a leptospirose apresentava diversas formas clínicas, passaram a identificar leptospiros sorologicamente distintas, associando-as com cada tipo de doença produzida. Atualmente a classificação sorológica é feita com base nas diferenças estruturais dos carboidratos que compõem a cadeia lateral do LPS por meio do teste de absorção de aglutinação cruzada (CAAT – *Cross agglutination absorption test*). Sorovares antigenicamente relacionados são classificados em sorogrupos. Aproximadamente 24 sorogrupos e 250 sorovares patogênicos já foram identificados (CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009).

Análises filogenéticas dos genes dos RNAs ribossomais 16S dividem as espécies de leptospiros em três grupos: patogênicas, intermediárias e saprofíticas (EVANGELISTA; COBURN, 2010; FAINE et al., 1999). Atualmente há 20 espécies descritas por meio da técnica de hibridização de DNA, sendo 8 patogênicas (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. santarosai*, *L. alexanderi* e *L. alstoni*), 5 intermediárias (*L. wolfii*, *L. licerasiae*, *L. inadai*, *L. fainei* e *L. broomi*) e 7 saprofíticas (*L. kmetyi*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. biflexa*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. yanagawae*). Porém, a classificação das leptospiros em espécies não tem grande relevância epidemiológica e por isso a classificação sorológica ainda é a base taxonômica para as leptospiros. O teste de microaglutinação (MAT) é utilizado para classificar clinicamente as leptospiros em sorogrupos e embora não haja uma padronização para a nomenclatura desses sorogrupos, eles são práticos para estudos epidemiológicos (CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009; EVANGELISTA; COBURN, 2010; LEVETT, 2001).

1.3 Leptospirose

A leptospirose humana foi descrita pela primeira vez em 1886, por Adolf Weil, como uma doença infecciosa caracterizada por esplenomegalia, icterícia, febre e nefrite, mas somente a partir da Primeira Guerra Mundial que os estudos sobre a

leptospirose se intensificaram. Por volta de 1920 todos os conhecimentos básicos sobre a leptospirose existentes hoje em dia já haviam sido dominados (FAINE et al., 1999).

Os primeiros registros da doença foram feitos em soldados, mineradores, limpadores de esgoto e plantadores de arroz. Desde então já associavam condições ambientais e ocupacionais com a incidência de uma moléstia ictérica, porém, somente no início do século XX, quando pesquisadores japoneses descreveram o papel dos ratos como hospedeiros crônicos da leptospira, que os princípios epidemiológicos da sua transmissão puderam ser mais bem compreendidos (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

1.3.1 Epidemiologia e transmissão

A leptospirose é uma zoonose bacteriana de distribuição mundial. Possui alta incidência em países tropicais onde o clima quente e úmido favorece a sobrevivência da bactéria na natureza. Nas regiões temperadas a doença foi negligenciada por muito tempo, principalmente pelo baixo número de casos registrados em humanos e pela alta eficácia do tratamento, mas nos últimos anos vários casos têm sido relatados o que indica que a leptospirose está reemergindo e se difundindo amplamente pelo mundo todo (LEVETT, 2001; LIM, 2011; WASINSKI; DUTKIEWICZ, 2013).

Anualmente são registrados até 100.000 casos de leptospirose em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). As diferenças climáticas, bem como no padrão social da população mundial fazem com que o perfil epidemiológico da leptospirose seja variado. No Brasil é considerada uma doença endêmica, com surtos epidêmicos nas estações chuvosas, principalmente entre populações de baixa renda que vivem em condições precárias de higiene nos grandes centros urbanos (MCBRIDE et al., 2005). A Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Brasil registrou 40.062 casos de leptospirose entre os anos 2001 e 2011, sendo o maior número de registros nas regiões sul e sudeste (BRASIL, 2012).

Os fatores de risco para leptospirose são variados e geralmente estão relacionados com o contato entre o humano e o animal. Roedores, animais de pecuária, cachorros e porcos são os principais reservatórios. Esses animais albergam as leptospiras nos túbulos renais proximais e as eliminam vivas na urina

contaminando o ambiente. Alguns sorovares têm sido associados com reservatórios específicos (ELLIS, 2011; HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; LIM, 2011; PICARDEAU, 2013). O homem é considerado hospedeiro acidental e pode se infectar por contato direto da pele lesionada e/ou mucosa com urina e tecido de animais contaminados, ou indiretamente ao entrar em contato com água e solo contaminados com a urina desses animais. A transmissão entre humanos não é considerada importante, apesar de estudos já terem relatado a presença de leptospiros em urina humana (BAL et al., 1994; CHOW et al., 2012). Em um estudo realizado na Amazônia Peruana o DNA de leptospira foi encontrado na urina de 13 dos 314 participantes, sendo que 10 deles apresentavam testes sorológicos negativos. Acredita-se que o baixo pH da urina humana limita a sobrevivência das leptospiros na mesma (GANOZA et al., 2010).

O mais tradicional fator de risco é o ocupacional. A ocupação de maior risco em todo o mundo é a relacionada com a pecuária. Plantadores de arroz, pescadores e veterinários também são considerados de alto risco (LEVETT, 2001; WASINSKI; DUTKIEWICZ, 2013). O contato direto com a urina dos animais contaminados é a principal via de infecção para esses trabalhadores, mas carcaças, placentas e fetos abortados contaminados também podem ser fontes de contaminação. A avaliação da presença de zoonoses em uma população rural do Paraná, Brasil, identificou leptospirose em 12,1% dos participantes do estudo (GONÇALVES et al., 2013). Outras ocupações de risco são as que envolvem contato direto com roedores e/ou seus excrementos, como mineradores, trabalhadores de esgoto, caçadores e soldados. Lupi et al. (2013) encontraram leptospiros entre militares do Rio de Janeiro, Brasil.

A migração da população rural para os centros urbanos acabou transformando a leptospirose em uma doença metropolitana. Os roedores são os principais portadores responsáveis por disseminar a leptospira nessas regiões e o sorovar Copenhageni é o mais associado com essas infecções (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). A falta de condições higiênico-sanitárias associada às chuvas intensas e alagamentos produz uma condição ecológica favorável para a transmissão de leptospiros oriundas desses animais. Quase 70% das amostras de soros de ratos (*Rattus norvegicus*) provenientes de favelas localizadas em Salvador, Brasil, foram positivas para *Leptospira* spp. (COSTA et al., 2014). Leptospirose

contraída de ratos e camundongos tratados como animais domésticos também já foi relatada (GAUDIE et al., 2008).

Animais domésticos, atualmente, também têm sido importantes fatores de risco, principalmente os cachorros. Estudos sorológicos realizados na cidade de Curitiba, por dois anos consecutivos, revelaram a presença de leptospiros em 14,4% e 38,9% dos cachorros analisados, em 2009 e 2010 respectivamente, sendo os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae os mais prevalentes (MARTINS et al., 2013). Outros animais que estão cada vez mais próximos do homem são os gatos. Por muito tempo foram considerados resistentes à infecção por leptospira, no entanto estudos têm modificado esse pensamento ao mostrarem gatos soropositivos principalmente para leptospiros do sorogrupo Canicola e Sejroe (WASINSKI; DUTKIEWICZ, 2013). No Brasil, só há um estudo envolvendo felinos selvagens em que os resultados se mostraram inconclusivos (ULLMANN et al., 2012). Considerando a natureza dos gatos em caçarem ratos e a proximidade desses animais com cachorros domésticos e com o homem, atenção para esses animais como risco de infecção deve ser tomada, no entanto mais estudos epidemiológicos são necessários.

A respeito dos diferentes padrões epidemiológicos apresentados pela leptospirose ao redor do mundo, a exposição recreacional tem sido o fator de risco mais importante para os países temperados nos últimos anos. O surto mais recente relacionado com atividade recreacional foi em 2012, em Sri Lanka. Dos 20 participantes de uma excursão em que praticaram rafting, 6 apresentaram sintomas característicos de leptospirose duas semanas após o passeio, e 17 dos 19 participantes que foram conduzidos para investigação epidemiológica apresentaram anticorpos antileptospira (AGAMPODI et al., 2014). Na Áustria foram confirmados 4 casos de leptospirose entre triatletas após atividade realizada em Langau, Baixa Áustria (RADL et al., 2011).

Condições ambientais, ocupações e atividades recreacionais aquáticas são os principais fatores de risco que modulam a situação epidemiológica da leptospirose no mundo todo. Entretanto, o difícil diagnóstico da leptospirose e a falta de sistemática para monitoramento e notificação da doença acabam subestimando o real número de casos. A atenção voltada somente para os casos mais severos também dificulta o seu estudo epidemiológico, fazendo com que os conhecimentos a

respeito da prevalência da doença sejam limitados e muitas vezes o verdadeiro risco da doença não seja valorizado.

1.3.2 Aspectos clínicos

A leptospirose possui um amplo espectro de apresentações clínicas, variando desde sintomas leves, semelhantes aos de um resfriado ou gripe, até hemorragias severas multissistêmicas. Infecções subclínicas ou brandas são as mais comuns e são ocasionadas principalmente quando sorovares de leptospira colonizam animais portadores, ou seja, adaptados (GUERRA, 2009). É um importante problema de saúde pública com elevado impacto econômico e social. Em animais como bois, porcos e cavalos provoca geralmente abortos e nascimentos prematuros. Uveíte é a principal manifestação clínica entre cavalos, podendo muitas vezes levar à cegueira. Em cães pode provocar febre, vômitos, desidratação e hemorragia pulmonar (GUERRA, 2009).

O homem é considerado hospedeiro acidental e terminal da doença e manifestações clínicas variadas também podem ocorrer na leptospirose humana. Durante muito tempo as diversas síndromes clínicas eram associadas a sorogrupos específicos de leptospira, porém não há estudos que suportem essa associação e atualmente esse conceito está em desuso. O homem é infectado geralmente por leptospiros do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, sorogrupo prevalente também no Brasil (LEVETT, 2001).

Clinicamente a leptospirose humana pode se apresentar em duas fases: septicêmica (aguda) e imune (crônica). A fase aguda se inicia por volta de 5 a 14 dias após o contato com o microrganismo mas geralmente é assintomática. Uma doença febril de início súbito e que cessa espontaneamente pode ocorrer. Sintomas como calafrios, náuseas, vômitos, dores de cabeça e musculares também podem estar presentes. Erupções cutâneas podem ocorrer no primeiro ou segundo dia após a infecção, geralmente são localizadas nos troncos e pernas e desaparecem após 24 horas. Sufusão conjuntival pode aparecer no final dessa fase (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

A segunda fase se inicia com a produção de anticorpos. Na maioria dos casos também é assintomática ou de forma branda, com sintomatologia semelhante à da primeira fase. Como as dores de cabeça são, geralmente, acompanhadas de

fotofobia e dor retro-orbital, a leptospirose pode ser confundida com a dengue. Mialgia por conta de inflamação das fibras musculares ocorre principalmente na parte inferior das costas, nas coxas e panturrilhas. Meningite asséptica é rara e mais comum em pessoas jovens. Uveíte também é rara, mas pode surgir até vários anos depois da primeira fase como um processo autoimune (FAINE et al., 1999; GUERRA, 2009; LEVETT, 2001).

Cerca de 5-10% dos casos de leptospirose evoluem para uma forma severa da doença de natureza multissistêmica conhecida como síndrome de Weil. Caracterizada por icterícia, insuficiência renal aguda e hemorragia, a doença de Weil é responsável por 5-15% das mortes provocadas pela leptospirose (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; LEVETT, 2001). Ela surge entre o 3º e o 4º dia após a fase aguda cessar, como uma febre recorrente de até 40 °C. Alguns sintomas da primeira fase, como calafrios e dor de cabeça, reaparecem muito mais intensos. Epistaxe e outras hemorragias começam a surgir. Uremia e icterícia surgem como sinais de falha renal e hepática, respectivamente (FAINE et al., 1999). A insuficiência renal causada por leptospirose é caracterizada por hipocalcemia e ausência de oligúria, sendo a presença de oligúria um prognóstico ruim (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; MCBRIDE et al., 2005). Trombocitopenia está presente na maioria dos casos e pode ser um fator de risco para insuficiência renal aguda (CHIERAKUL et al., 2008; DAHER et al., 2014; LEVETT, 2001).

Outra manifestação severa da leptospirose que vem chamando a atenção dos profissionais de saúde nesses últimos anos é a Síndrome Hemorrágica Pulmonar associada à Leptospirose (LPHS). As manifestações pulmonares na maioria das vezes não estão associadas à forma ictérica da leptospirose. Os principais sintomas são tosse, dor no peito, dispneia e hemoptise. A tosse é geralmente seca e surge ainda na fase de septicemia. A hemoptise é devido à hemorragia pulmonar massiva que geralmente leva a insuficiência respiratória culminando em morte. Os sintomas surgem por volta do quarto ao sexto dia após o início da infecção e apresentam uma evolução rápida levando o paciente a óbito em 72 horas. Mais de 50% dos casos de LPHS são fatais (GULATI; GULATI, 2012; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; LEVETT, 2001). Depósitos de C3 e imunoglobulinas foram encontrados em alvéolos de hamsters com hemorragia pulmonar. Esses mesmos depósitos foram encontrados também em pulmões de pacientes levados ao óbito por LPHS, sugerindo que um processo autoimune esteja

envolvido no desenvolvimento dessa síndrome (CRODA et al., 2010; NALLY et al., 2004). Entretanto, o aparecimento precoce dos sintomas da LPHS pode indicar danos causados diretamente pela leptospira.

1.3.3 Diagnóstico laboratorial

A inespecificidade e diversidade dos sintomas da leptospirose dificultam o seu diagnóstico com base apenas nas apresentações clínicas, tornando-o dependente de exames laboratoriais. Existem diversos exames bacteriológicos e sorológicos direcionados para o diagnóstico da leptospirose, porém nenhum deles permite que a doença seja diagnosticada de maneira fácil e rápida, logo no início da infecção. Por isso, a escolha do teste mais adequado dependerá principalmente da fase da doença em que se encontra o paciente.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que testes diferentes sejam utilizados em conjunto para que o diagnóstico da leptospirose seja confiável (WHO, 2003). O teste sorológico de MAT e a recuperação de leptospiras de fluidos biológicos e/ou tecidos por meio de cultivo *in vitro* são os únicos exames reconhecidos para diagnóstico conclusivo de leptospirose. No entanto, devido ao crescimento fastidioso das leptospiras em meio de cultura a OMS não recomenda seu uso na rotina diagnóstica (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; WHO, 2003).

O MAT foi desenvolvido há quase 100 anos, no Instituto Pasteur, e continua sendo considerado pela OMS como teste “padrão ouro” para o diagnóstico da leptospirose (PICARDEAU, 2013; PICARDEAU et al., 2014). Ele consiste na incubação de soros suspeitos com leptospiras vivas ou formalizadas de diferentes sorovares. A aglutinação é observada em microscopia de campo escuro, e o título é determinado como a maior diluição do soro em que 50% das bactérias se encontram aglutinadas, quando comparadas com o controle. O valor de referência para a soroconversão é estabelecido de acordo com a região geográfica. Geralmente, em regiões não endêmicas a soroconversão é considerada quando o título é igual ou superior a 100; o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) nos Estados Unidos define como um provável caso de leptospirose quando o título é maior ou igual a 200. Já em áreas endêmicas geralmente um título maior ou igual a 400 é considerado para soroconversão (LEVETT, 2001; PICARDEAU, 2013).

Para aumentar a sensibilidade do MAT, amostras pareadas de soro coletadas na fase de bacteremia e na fase imune da doença devem ser utilizadas. No Brasil, a SVS recomenda um intervalo de 14 a 21 dias entre as coletas. Dessa maneira, a soroconversão será considerada quando o título da segunda amostra for maior ou igual a 200, caso a primeira amostra não seja reagente, ou pelo menos 4 vezes maior do que o da primeira amostra. Quando não houver disponibilidade de amostras pareadas será considerado soroconversão um título maior ou igual a 800 (BRASIL, 2009).

Um painel de sorovares que sejam representativos dos principais sorogrupos de leptospira também deve ser utilizado para que o MAT seja altamente sensível. A OMS recomenda um painel com 19 sorovares representativo de 16 sorogrupos, além da inclusão de isolados locais (WHO, 2003).

O MAT é um teste de alta sensibilidade e especificidade, porém só se torna útil após o início da fase imune da doença, por volta de 10 dias após o início da doença, quando começa a produção de anticorpos (MUSSO; LA SCOLA, 2013). Ele é capaz de detectar IgM e IgG e permite a identificação do sorogrupo infectante, mas não discrimina se os anticorpos produzidos são decorrentes de uma infecção ou de uma vacinação (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; PICARDEAU, 2013). Além disso, o MAT é um teste de difícil interpretação, exigindo experiência por parte do profissional que irá realizá-la. A necessidade de manter culturas vivas em laboratórios faz com que a realização do MAT seja restrita aos laboratórios de referência. Por causa das limitações apresentadas pelo MAT existem vários estudos que têm como objetivo o desenvolvimento de um teste sorológico de diagnóstico rápido e precoce da leptospirose, porém até hoje nenhum teste apresentou sensibilidade e especificidade suficientes para substituir o MAT.

Testes baseados na técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) vêm sendo amplamente aplicados, sendo ELISA-IgM o teste reconhecido pela OMS. É um teste altamente sensível e específico, capaz de detectar IgM logo na primeira semana da doença, por volta do 7º dia após o aparecimento dos sintomas. Existem vários kits comerciais disponíveis no mercado, mas pode ser preparado no próprio laboratório a partir de culturas de leptospira, geralmente da espécie *biflexa* (WHO, 2003). Trata-se de um teste genérico, não permitindo detectar o sorogrupo da leptospira infectante, mas por outro lado permite diferenciar se os anticorpos detectados pelo MAT são de uma infecção corrente ou de uma

imunização ativa prévia. O ELISA-IgM geralmente é negativo para infecções provocadas por leptospiros do sorogrupo Grippothyposa e Australis (MUSSO; LA SCOLA, 2013). Por isso a SVS recomenda que esse teste seja utilizado para selecionar amostras que deverão ser utilizadas pelo MAT para confirmação do diagnóstico de leptospirose (BRASIL, 2009).

Apesar da alta especificidade e sensibilidade apresentada pelo teste ELISA-IgM, trata-se ainda de um teste que exige experiência e acesso laboratorial. Por isso muitos esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de um teste rápido que dispense treinamento técnico elevado e permita a detecção da leptospirose inclusive em áreas com poucos recursos médicos. Vários métodos têm sido testados em diversas regiões no mundo (PICARDEAU et al., 2014). Desde 2010 vem sendo produzido no Brasil pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), em parceria com Biomanguinhos, um teste rápido utilizando a metodologia *Dual Path Platform* (DPP®) que permite o diagnóstico da leptospirose em 15 minutos. Esse teste utiliza como antígeno altas concentrações de proteínas recombinantes Lig e está em processo de validação junto à Agência de Vigilância Sanitária (Anvisa) (NABITY et al., 2012). Um estudo mais recente, realizado por um grupo de pesquisa da Irlanda em parceria com um grupo brasileiro, descreveu a validação de um teste rápido utilizando a metodologia de aglutinação com partículas de látex, uma metodologia mais barata em relação ao ELISA e DPP®. O teste apresentou boa especificidade e sensibilidade quando comparado ao MAT, inclusive em áreas endêmicas, e poderia ser utilizado como triagem para agilizar o processo de diagnóstico (BROWNLOW et al., 2013).

Os testes rápidos permitem que o diagnóstico da leptospirose seja mais rápido, mais precoce e, às vezes, mais acessível do que o MAT, mas como dependem da produção de anticorpos só são eficientes após a primeira semana do início dos sintomas da doença. Entretanto, dado a diversidade clínica da leptospirose, seu diagnóstico diferencial precoce é de extrema importância para que seu tratamento seja iniciado o mais rápido possível. A WHO (2003) recomenda que doenças como influenza, dengue, febre amarela, malária, hepatite viral e AIDS sejam consideradas para o diagnóstico diferencial.

O teste mais eficiente para o diagnóstico precoce da leptospirose é o teste molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR). Vários protocolos vêm sendo desenvolvidos desde os anos 90 para a detecção de DNA de leptospira em

amostras clínicas, sendo os mais utilizados baseados em sequências de genes ribossomais *rrs* combinados com genes da translocase *secY* e da flagelina *flaB* (WHO, 2003). Normalmente são utilizadas amostras de plasma colhido com EDTA durante a fase aguda da doença (PICARDEAU et al., 2014). Por se tratar de uma técnica de alto custo, no Brasil ainda é utilizada somente por laboratórios de referência como teste confirmatório, caso não haja soroconversão, ou após o paciente ir ao óbito, para fins epidemiológicos (BRASIL, 2009).

1.3.4 Profilaxia e tratamento

A leptospirose é uma doença de notificação compulsória no Brasil e a comunicação da ocorrência de casos e/ou surtos, suspeitos ou confirmados, para os órgãos de vigilância é fundamental para que medidas de controle sejam implementadas de maneira adequada. As medidas de controle e prevenção da leptospirose são voltadas principalmente para a fonte de infecção, vias de transmissão e a doença provocada nos humanos (WHO, 2003).

Quando é possível identificar a fonte de infecção, medidas como imunização dos animais domésticos, antirratização e desratização, e descarte adequado de carcaças e restos de animais, bem como de suas excretas e resíduos alimentares, são as melhores opções. Para evitar a transmissão da infecção é fundamental que a população seja educada sobre os riscos e meios de transmissão da doença de forma que possam auxiliar nos programas de controle e prevenção. Melhoria nas condições higiênico-sanitárias, como canalização e tratamento de esgotos, o tratamento de água e alimentos utilizados para consumo humano, e a limpeza e desinfecção de ambientes atingidos por água e lama provenientes de enchentes, evitam a dispersão da bactéria pelo ambiente. As leptospirosas são sensíveis à ação de desinfetantes a base de iodo e cloro, assim como a dessecação (GUERRA, 2009). O uso de equipamentos de proteção individual ajuda a diminuir o risco ocupacional.

Quanto ao controle da infecção no homem, geralmente é realizado o tratamento com antibióticos e terapia de suporte, caso o paciente apresente a forma severa da doença. Quando a doença ocorre em sua forma branda o tratamento sintomático na maioria das vezes é suficiente. A antibioticoterapia deve ser iniciada o mais rápido possível, pois reduz significativamente a severidade da doença quando

iniciada logo na primeira semana de infecção (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Amoxicilina e doxiciclina são geralmente administrados via oral quando o paciente se encontra ainda na fase inicial da doença, entretanto doxiciclina é nefrotóxico e por isso não deve ser administrado em mulheres grávidas, crianças e pacientes com insuficiência renal. Nesse caso, azitromicina e claritromicina são alternativas. Para pacientes com a forma severa da doença é recomendado o tratamento com penicilina G administrado via intravenosa por pelo menos 7 dias, até o paciente ter condições de receber medicação oral. Ampicilina e ceftriaxona também podem ser utilizados (FAINE et al., 1999; BRASIL, 2009).

Reações de Jarisch-Herxheimer (JH) podem ocorrer após a antibioticoterapia, porém parecem ser menos comuns do que em infecções causadas por outras espiroquetas. Caracterizada por febre entre 37,8 e 38,4 °C, rigidez severa e hipotensão, essa reação é uma resposta inflamatória aguda causada por citocinas estimuladas por toxinas resultantes da lise bacteriana. Apesar de a reação de JH não ser impedimento para antibioticoterapia da leptospirose, o conhecimento sobre esse evento ainda é muito escasso e por isso é recomendado que todos os pacientes com leptospirose que receberem tratamento com antibióticos sejam rigorosamente monitorados (FAINE et al., 1999; GUERRIER; D'ORTENZIO, 2013).

Pacientes com leptospirose severa devem ser hospitalizados e a terapia de suporte também deve ser iniciada rapidamente a fim de evitar complicações e mau prognóstico. Nos primeiros dias de internação é importante que seja realizado monitoramento cardíaco. A presença de azotemia requer hidratação e manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico. O volume urinário e função renal devem ser monitorados constantemente para realização de diálise peritoneal precoce, caso se faça necessário, a fim de evitar danos renais severos. Punção lombar muitas vezes é realizada em pacientes com dores de cabeça severas e ausência de icterícia. Pacientes com hemorragia severa podem necessitar de transfusão sanguínea, e pacientes com LPHS geralmente requerem intubação e ventilação mecânica (FAINE et al., 1999; GUERRA, 2009; LEVETT, 2001; BRASIL, 2009).

Apesar das medidas de controle e prevenção serem eficientes, são medidas difíceis de serem implementadas e, portanto, a melhor alternativa para a prevenção da leptospirose seria a vacinação. Vacinas para humanos e animais existem desde a década de 20 e consistem em suspensões de bactérias mortas (bacterinas) (FAINE

et al., 1999). A proteção é conferida pela imunidade humoral gerada pela produção de anticorpos contra o LPS. No entanto essa proteção é sorovar dependente e pouco duradoura, exigindo que doses de reforços sejam aplicadas a cada 6 ou 12 meses. Além disso, as bacterinas ocasionam diversos efeitos colaterais como febre, vômitos e dor no local da aplicação (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; FAINE et al., 1999). Por esses motivos atualmente essas vacinas só são utilizadas para imunização de animais e estão licenciadas para uso em humanos somente em alguns países como Japão, China e Cuba (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; DELLAGOSTIN et al., 2011; KOIZUMI; WATANABE, 2005).

A falta de segurança apresentada pelas bacterinas torna necessário o desenvolvimento de novas vacinas. O grande avanço da biotecnologia molecular no final na década de 90 fez com que o foco das pesquisas se voltasse para a busca de antígenos recombinantes que sejam capazes de induzir uma imunidade duradoura e de amplo espectro. Considerando que as proteínas de membrana externa (OMPs) localizadas na superfície da leptospira são os primeiros componentes da bactéria a entrarem em contato com o sistema imunológico do hospedeiro, e são capazes de induzir memória imunológica, essas moléculas são atraentes objetos de estudo para o desenvolvimento de uma vacina recombinante.

O primeiro estudo utilizando proteínas recombinantes de leptospira como candidato vacinal foi publicado em 1999, por Haake e colaboradores. As proteínas recombinantes OmpL1 e LipL41 exibiram um efeito protetor sinérgico em hamsters desafiados com a *L. kirschneri* sorovar Grippotyphosa (HAAKE et al., 1999). Desde então diversos estudos têm se concentrado na obtenção de uma vacina de subunidade e muitos antígenos proteicos de superfície têm sido testados como potencial candidato vacinal (Quadro 1).

Quadro 1 – Principais candidatos vacinais avaliados experimentalmente

Candidato Vacinal	Expressão	Adjuvante	nº sobreviventes/ nº total animais	Referência
LipL41	<i>E. coli</i> – OMP <i>E. coli</i> – His ₆	- Alúmen	V 5/22 e C 3/15 V 2/9 e C 1/9	Haake et al., 1999
OmpL1	<i>E. coli</i> – OMP <i>E. coli</i> – His ₆ Adenovírus	- Alúmen -	V 10/24 e C 3/15 V 4/9 e C 1/9 V 11/30 e C 17/33	Haake et al., 1999 Branger et al., 2001
LipL41+OmpL1	<i>E. coli</i> – OMP <i>E. coli</i> – His ₆	- Alúmen	V 17/24 e C 6/24 V 3/9 e C 1/9	Haake et al., 1999
LipL32/Hap1	Adenovírus <i>E. coli</i> – His ₆ BCG <i>E. coli</i> – His ₆	- Freund - LTB	V 26/30 e C 17/33 V 0/15 e C 2/15 V 12/20 e C 4/20 V 25/30 e C 4/15	Branger et al., 2001 Branger et al., 2005 Seixas et al., 2007 Grassmann et al., 2012
LigA	<i>E. coli</i> – His ₆ <i>E. coli</i> – GST <i>E. coli</i> – His ₆ <i>E. coli</i> – His ₆ <i>Pichia pastoris</i>	Freund Alúmen Freund Freund -	V 9/10 e C 0/11 V 21/21 e C 15/20 V 34/44 e C 0/44 V 8/8 e C 0/8 V 9/12 e C 0/12	Koizumi; Watanabe, 2004 Palaniappan et al., 2006 Silva et al., 2007 Coutinho et al., 2011 Hartwig et al., 2014
LigB	<i>E. coli</i> – His ₆ <i>E. coli</i> – His ₆ <i>E. coli</i> – His ₆ /GST <i>E. coli</i> – GST	Freund Freund Alúmen Emulsigen® D	V 9/10 e C 0/11 V 3/28 e C 0/28 V 20/24 e C 4/24 V 14/30 e C 0/6	Koizumi; Watanabe, 2004 Silva et al., 2007 Yan et al., 2009 Cao et al., 2011
LigA + LigB	<i>E. coli</i> – GST	Freund	V 10/10 C 1/16	Koizumi; Watanabe, 2004
rLp1454	<i>E. coli</i> – GST	Alúmen	V 5/7 e C 3/7	Chang et al., 2007
rLp1118	<i>E. coli</i> – GST	Alúmen	V 6/8 e C 3/7	Chang et al., 2007
Mcell	<i>E. coli</i> – GST	Alúmen	V 7/7 e C 3/7	Chang et al., 2007
rLp1454+ rLp1118+Mcell	<i>E. coli</i> – GST	Alúmen	V 7/8 e C 4/8	Chang et al., 2007
Lp4337	<i>E. coli</i> – GST	Emulsigen® D	V 13/18 e C 3/18	Yan et al., 2010
Lp3685	<i>E. coli</i> – GST	Emulsigen® D	V 10/18 e C 3/18	Yan et al., 2010
Lp0222	<i>E. coli</i> – GST	Emulsigen® D	V 7/18 e C 3/18	Yan et al., 2010
LIC10494	<i>E. coli</i> – His ₆	Alúmen	V 7/17 e C 2/18	Atzingen et al., 2010
LIC12730	<i>E. coli</i> – His ₆	Alúmen	V 8/18 e C 2/18	Atzingen et al., 2010
Lsa21	<i>E. coli</i> – His ₆	Alúmen	V 5/20 e C 2/20	Atzingen et al., 2012
Lsa66	<i>E. coli</i> – His ₆	Alúmen	V 5/20 e C 2/20	Atzingen et al., 2012
rLIC11030	<i>E. coli</i> – His ₆	Alúmen	V 6/20 e C 2/20	Atzingen et al., 2012
LemA	<i>E. coli</i> – His ₆	Alúmen	V 4/8 e C 0/6	Hartwig et al., 2013

Abreviaturas: V - vacinados; C – controle. LTB – toxina termolábel. OMP – proteína de membrana externa. His₆ – 6 resíduos de histidina. GST – Glutathione S-transferase.

O sequenciamento completo de genomas bacterianos permitiu o surgimento de uma nova abordagem para o desenvolvimento de vacinas, a “vacinologia reversa”. Nessa metodologia, potenciais antígenos protetores proteicos são identificados por análises de bioinformática do genoma sequenciado. Essa estratégia permite que proteínas com potencial imunogênico sejam identificadas mesmo quando expressas em baixa quantidade e sem que seja necessário o cultivo do microrganismo *in vitro* (RAPPUOLI, 2000). Ela surgiu junto com o sequenciamento completo do genoma da *Neisseria meningitidis* sorogrupo B (PIZZA et al., 2000; TETTELIN et al., 2000) e tem se mostrado muito eficiente, pois permitiu o desenvolvimento de uma vacina que está sendo atualmente licenciada para uso na Europa (SEIB; ZHAO; RAPPUOLI, 2012).

Atualmente cinco espécies de *Leptospira* já foram sequenciadas: *L. interrogans* sorovar Lai cepas 56601 e IPAV (REN et al., 2003; ZHONG et al., 2011), *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (NASCIMENTO et al., 2004a,b), *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis cepas L550 e JB197 (BULACH et al., 2006), *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1 (Paris e Ames) (PICARDEAU et al., 2008a), *L. santarosai* sorovar Shermani cepa LT821 (CHOU et al., 2012) e *L. licerasiae* cepas VAR010 e MMD0835 (RICALDI et al., 2012). Vários estudos têm aplicado a vacinologia reversa para a busca de candidatos vacinais para a leptospirose (ATZINGEN et al., 2010, 2012; CHANG et al., 2007; FELIX et al., 2011; YAN et al., 2010;).

Uma proteína bastante explorada e que tem se mostrado um promissor candidato vacinal é a LigA. Junto com LigB e LigC formam uma família de proteínas de leptospira pertencentes à superfamília *bacterial immunoglobulin-like* (Big). LigA e LigB são proteínas altamente conservadas, expressas durante a infecção e que estão presentes somente em leptospiros patogênicas (MATSUNAGA et al., 2003). O primeiro estudo avaliando a atividade imunoprotetora da LigA demonstrou a sobrevivência de 90% dos animais desafiados com *L. interrogans* sorovar Manilae (KOIZUMI; WATANABE, 2004). Alguns estudos também demonstram um potencial imunoprotetor para a LigB, no entanto o domínio Big não parece ser o responsável por essa proteção (CAO et al., 2011; COUTINHO et al., 2011; SILVA et al., 2007; YAN et al., 2009).

Outra estratégia que tem se mostrado bastante interessante é o desenvolvimento de vacinas de DNA. Essas vacinas possuem a vantagem de

apresentarem baixo custo em relação às vacinas recombinantes. Para a leptospirose ainda há poucos estudos utilizando essa abordagem, mas esses têm se mostrado muito promissores (VERMA et al., 2012; WANG; JIN; WEGRZYN, 2007).

Mesmo com alguns resultados animadores, estudos com o mesmo antígeno às vezes são divergentes entre si. LipL32 e LigA recombinantes, por exemplo, não conferiram proteção em hamsters (LUCAS et al., 2011). Essas divergências são provavelmente devido à falta de padronização nos ensaios de imunoproteção (DELLAGOSTIN et al., 2011; VERMA et al., 2012). Importante ainda ressaltar que mesmo conferindo proteção, nenhuma das proteínas testadas até hoje exibiram efeito esterilizante, com exceção da LipL32 expressa em BCG recombinante (SEIXAS et al., 2007). Mais estudos são necessários para o desenvolvimento de uma nova vacina.

1.4 Patogenia e fatores de virulência

As leptospiros entram no hospedeiro por meio da pele lesionada ou úmida e mucosa. Para estabelecer a infecção elas utilizam diversas estratégias de modo que consigam ultrapassar barreiras teciduais e se disseminar pela circulação sanguínea até chegar ao órgão alvo.

A invasão e colonização dos tecidos do hospedeiro são passos importantes para o início da infecção. Uma das estratégias utilizadas pelas leptospiros nesse estágio inicial é a adesão às células do hospedeiro. Estudos demonstraram que as leptospiros são capazes de se ligarem às células endoteliais, células epiteliais renais, fibroblastos e macrófagos cultivados *in vitro* (LIU et al., 2007; THOMAS; HIGBIE, 1990). A interação com as células de mamíferos ocorre por meio de ligação aos receptores CAMs (*cell adhesion molecules*) que se encontram na superfície dessas células e estão envolvidos na interação célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC). Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram pela primeira vez que leptospiros estimulam o aumento da expressão de ICAM-1 (*intercellular CAM*) e E-selectina em células endoteliais, e que OMPs estão envolvidas nesse processo (ATZINGEN et al., 2009; GOMEZ et al., 2008; PRETRE et al., 2013; VIEIRA et al., 2007). A habilidade das leptospiros se ligarem à VE-caderina e ICAM-2 foi demonstrada recentemente por outro grupo de pesquisa (EVANGELISTA et al., 2014). Adicionalmente, as leptospiros são capazes de

invadirem temporariamente células epiteliais e atravessarem rapidamente a monocamada de células (CINCO, 2010).

Outra estratégia utilizada pelas leptospiros para invadir e colonizar o hospedeiro é a adesão aos componentes da MEC. Leptospiros são capazes de se ligarem à laminina, colágenos I e IV, fibronectina plasmática e celular, elastina e proteoglicanos (VIEIRA et al., 2014). As proteínas de superfície exercem papel fundamental nessa interação, e a primeira adesina de leptospira descrita foi uma proteína de 36 kDa que se mostrou capaz interagir com fibronectina (MERIEN et al., 2000). A partir daí foi demonstrado a interação de diversas proteínas com a MEC, inclusive as proteínas LigA e LigB, as proteínas *endostatin-like* (Len) e a lipoproteína LipL32 (VIEIRA et al., 2014).

Ao alcançar a corrente sanguínea as leptospiros precisam superar o sistema imunológico do hospedeiro para conseguirem se disseminar e atingir outros tecidos. Os primeiros componentes com que se deparam são os do sistema imune inato. Há anos atrás já havia sido observado que as leptospiros patogênicas resistem à ação antibactericida do soro normal humano, enquanto que as saprofíticas são eliminadas rapidamente (JOHNSON; MUSCHEL, 1965; MERI et al., 2005). Uma das estratégias já comentadas é a invasão temporária de células, que permite não só que as leptospiros ultrapassem barreiras celulares, como também evitem seu reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, as leptospiros são capazes de sobreviver à ação de fagócitos e evadir o sistema complemento em pelo menos dois níveis diferentes.

O sistema complemento é um importante mecanismo da imunidade inata, e também da humoral, que tem a capacidade de reconhecer rapidamente e destruir patógenos por perfurações, opsonização de bactérias e produção de anafilatoxinas que recrutam neutrófilos e ativam macrófagos. Formado por uma complexa cascata de proteínas altamente regulada, o sistema complemento é organizado de tal forma que três vias distintas de inicialização (alternativa, clássica e lecitina) convergem para a formação de um complexo terminal citolítico. As leptospiros se ligam aos reguladores solúveis fator H e C4BP interferindo tanto na via alternativa como na via clássica do complemento. Esses reguladores ligados à bactéria mantêm sua atividade de cofator para a enzima fator I, responsável pela clivagem de C3b e C4b. Dessa maneira as leptospiros impedem a formação de C3 convertase evitando que

sejam destruídas pelo complexo de ataque a membrana (MAC – *membrane complex attack*) (BARBOSA et al., 2009; MERI et al., 2005; VERMA et al., 2006).

Poucas proteínas envolvidas no processo de evasão do sistema complemento foram descritas até o momento. A primeira descrição foi feita para a LfhA/Lsa24/LenA. Ela se liga ao fator h e fator H *related protein* (FHR-1) purificados (VERMA et al., 2006). Outras proteínas que são capazes de interagir com o fator H são as LigA e LigB, e o fator de elongação Tu. O fator H ligado a essas proteínas retém sua atividade de cofator (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; WOLFF et al., 2013). As proteínas Ligs também são capazes de se ligarem ao C4BP, assim como a proteína LcpA. O C4BP ligado a essas proteínas também retém sua atividade de cofator (BARBOSA et al., 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). Mais recentemente quatro proteínas foram descritas pelo nosso grupo de pesquisa como ligantes de C4BP, são elas Lsa30, Lsa25, Lsa33 e Lsa23 (DOMINGOS et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2012).

As leptospiros também utilizam enzimas proteolíticas para evadir o sistema imunológico do hospedeiro. O mecanismo mais bem elucidado é a utilização do sistema proteolítico plasminogênio/plasmina para invasão e evasão imune do hospedeiro. As leptospiros são capazes de se ligarem ao plasminogênio (PLG) por meio de seus resíduos de lisina. O PLG ligado é convertido em plasmina, no entanto o ativador do hospedeiro é necessário para que essa conversão ocorra. A plasmina ativada é capaz de degradar imunoglobulinas e C3b, bem como fibronectina, contribuindo para as habilidades da leptospira de invadir e evadir (VIEIRA et al., 2009, 2011). O sistema proteolítico parece ser importante para os estágios iniciais da infecção da leptospira; um trabalho recente demonstrou que o PLG sequestrado pela leptospira estimula a secreção dos ativadores tanto do tipo uroquinase como do tipo tecidual logo nas primeiras horas de infecção, com níveis decaindo ao longo do processo (VIEIRA et al., 2013). Um repertório muito grande de OMPs que atuam como receptores para o PLG já foi identificado, indicando que a interação das leptospiros com esse sistema proteolítico é de grande importância para a patogênese da leptospirose (DOMINGOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2012, 2014; HAUK et al., 2012; MENDES et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2011; SOUZA et al., 2012; VERMA et al., 2010; VIEIRA et al., 2010; WOLFF et al., 2013).

A secreção de enzimas proteolíticas foi descrita recentemente como mecanismo de evasão imune para leptospira. Proteases secretadas por leptospira clivam C3, C2, C4b e fator B inibindo as três vias do sistema complemento. Metaloproteases da família de termolisinas parecem ser as responsáveis por esse mecanismo (FRAGA et al., 2013).

Ainda na tentativa de driblar o sistema imunológico do hospedeiro, as leptospiros possuem a habilidade de sobreviverem dentro de células fagocitárias. Na ausência de anticorpos e opsoninas as leptospiros podem ser fagocitadas por neutrófilos por meio de interação com integrinas C3 presentes na superfície dessas células (CINCO et al., 2002). No entanto, as leptospiros são relativamente resistentes à ação de peróxidos, e a morte das bactérias parece ocorrer somente na presença de IgG opsonizantes (CINCO, 2010; FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2011). A proteína Mce de *L. interrogans* possui um motivo RGD que interage com integrinas $\alpha 5 \beta 1$ e $\alpha v \beta 3$ presentes na superfície de macrófagos e células endoteliais, podendo estar envolvida no processo de fagocitose em hospedeiros não imunes (ZHANG et al., 2012). As leptospiros também conseguem escapar dos fagolisossomos de macrófagos humanos para o citoplasma, porém ainda não se sabe exatamente como esse fenômeno ocorre (LI et al., 2010). Pesquisas utilizando zebrafish demonstraram leptospiros vivas dentro de macrófagos serem transportadas para locais distantes do sítio inicial da infecção (DAVIS; HAAKE; RAMAKRISHNAN, 2009).

O fibrinogênio é uma proteína plasmática que possui papel importante na coagulação sanguínea. Estudos especulam que a interação das leptospiros com essa glicoproteína possa favorecer o quadro hemorrágico da leptospirose severa. Sete receptores de leptospira já foram descritos para o fibrinogênio como interferindo na formação do coágulo de fibrina: LigB, rLIC12238, Lsa33, Lsa30, OmpL1, rLI11360 e rLIC11975. No entanto, os mecanismos propostos ainda precisam ser mais bem estudados (CHOY et al., 2011; LIN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013).

Devido aos avanços alcançados pelas tecnologias recombinantes e de genômica funcional, todos os mecanismos de patogenicidade da leptospira acima descritos foram desvendados muito recentemente. O sequenciamento completo do genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni permitiu a identificação de mais de 200 OMPs que podem estar envolvidas na patogênese da leptospirose, sendo que 150 são lipoproteínas com mais da metade sem ortólogos na espécie saprofítica

(NASCIMENTO et al., 2004b; XUE; YAN; PICARDEAU, 2009). Esses dados direcionaram os esforços dos pesquisadores, que conseguiram identificar dezenas de fatores envolvidos na penetração, colonização e evasão do hospedeiro pelas leptospiros. O papel multifuncional de muitas proteínas foi evidenciado, assim como a ampla redundância de adesinas e receptores do PLG, o que dificultou a caracterização da importância específica de cada proteína.

Somente com o desenvolvimento de técnicas de mutagenese e de complementação genética que pudessem ser aplicadas em leptospiros foi possível explorar o papel individual de genes e proteínas na patogenicidade das leptospiros (BOURHY et al., 2005; CRODA et al., 2008; MURRAY et al., 2009a). Essas técnicas permitiram a identificação de alguns fatores essenciais para a virulência da leptospiro.

O primeiro fator de virulência de leptospiro a ser definido geneticamente foi Loa22, uma lipoproteína de 22 kDa que contém um domínio OmpA na sua porção C-terminal (KOIZUMI; WATANABE, 2003). *L. interrogans* sorovar Lai que tiveram o gene *loa22* inativado pela inserção randômica de um transposon perderam a capacidade de provocar doença e morte em porquinhos da Índia e hamsters, mas não perderam a capacidade de invadirem e colonizarem os animais (RISTOW et al., 2007). No entanto, o real papel dessa proteína na patogênese da leptospirose ainda não foi elucidado, pois Loa22 demonstrou ser pouco eficiente como adesina (BARBOSA et al., 2006). Talvez seu papel esteja mais relacionado com a imunopatogenicidade e sobrevivência do que com virulência em si, pois alguns estudos demonstraram sua atividade citotóxica em macrófagos e células renais, bem como indução de apoptose em linhagem de células pulmonares (WU et al., 2011; ZHANG et al., 2008, 2010).

A motilidade foi definida como essencial para a virulência da leptospiro. O endoflagelo de espiroquetas possui uma estrutura complexa composta de proteínas FlaB, que constituem o cerne do endoflagelo, revestidas por proteínas FlaA. Na base do endoflagelo se localiza o corpo basal constituído de diversas proteínas, dentre elas as responsáveis pelo motor flagelar. FliY é a proteína responsável por direcionar esse motor flagelar; ela é comum entre espiroquetas porém rara entre outras bactérias, e a de leptospiro em especial possui um domínio homólogo à proteína YscQ que pertence ao sistema de secreção tipo III da *Yersinia pestis* (LIAO et al., 2009). A inativação do gene *flaB* resultou em cepas de *L. biflexa* imóveis e

sem endoflagelo (PICARDEAU; BRENOT; SAINT GIRONS, 2001). Posteriormente, dois estudos independentes demonstraram a importância da motilidade para o desenvolvimento da leptospirose. Cepas de leptospiros mutadas para os genes *fliY* ou *flaA2* perderam a capacidade de causarem doença em modelo animal. Entretanto, a inativação desse primeiro gene resultou na inativação dos genes *fliP* e *fliQ* e o efeito da atenuação da virulência bacteriana não pode ser atribuída exclusivamente ao *fliY*, assim como a inativação de *flaA2* resultou na inativação de *flaA1* (LAMBERT et al., 2012; LIAO et al., 2009).

O LPS, sendo o principal antígeno de leptospiros estimulador da resposta imune humoral do hospedeiro, também atraiu a atenção dos pesquisadores quanto a sua importância para a virulência da bactéria. Em 2010 foi definitivamente definido por ferramentas genéticas como um fator virulência. Leptospiros mutadas para 2 genes diferentes responsáveis pela biossíntese de LPS não foram capazes de causar leptospirose em hamsters, nem de colonizá-los. Anticorpos produzidos contra proteínas na superfície das bactérias mutantes podem ter impedido sua disseminação pela via hematogênica (MURRAY et al., 2010).

Outros fatores de virulência de leptospiros que foram definidos geneticamente são de origem proteica e o papel de alguns na patogenia da leptospirose já foi mencionado nessa revisão. Todos esses fatores demonstraram serem importantes para a virulência da bactéria, mas não necessariamente essenciais. A perda total da virulência pelas leptospiros, com ausência de danos aos tecidos e perda da capacidade de colonização, só foi demonstrada para leptospiros mutadas para os genes *flaA2*, *clpB* e os genes da biossíntese do LPS (LAMBERT et al., 2012; LOURDAULT et al., 2011; MURRAY et al., 2010). Um resumo dos fatores de virulência da leptospiros, com suas respectivas caracterizações pode ser visualizado no Quadro 2.

Quadro 2 – Fatores de virulência definidos geneticamente para leptospira

Fator de Virulência	Função	Técnica de Mutação	Modelo Animal	Referência
Loa22	Provável Imunopatogenicidade	Transposon	Hamster/Porquinho da Índia	Ristow et al., 2009
Motilidade	Invasão	Recombinação Homóloga/Transposon	Porquinho da Índia	Liao et al., 2009
			Hamster	Lambert et al., 2012
LPS	Endotoxina/Imunopatogenicidade	Transposon	Hamster	Murray et al., 2010
HemO	Hemeoxigenase	Transposon	Hamster	Murray et al., 2009b
InvA	Hidrolase Nudix	Recombinação Homóloga	Hamster	Luo et al., 2011
ClpB	Chaperona	Transposon	Esquilo da Mongólia	Lourdault et al., 2011
Mce	<i>Mammalian cell entry</i>	Recombinação Homóloga	Hamster	Zhang et al., 2012
KatE	Catalase exógena	Transposon	Hamster	Eshghi et al., 2012
LruA	ND	Transposon	Hamster	Zhang et al., 2013
ColA	Colagenase	Recombinação Homóloga	Hamster	Kassegne et al., 2013
HtpG/Hsp90	Chaperona	Transposon	Hamster	King et al., 2014

As técnicas de mutagênese também constataram o papel redundante de algumas proteínas, como a LipL32 e a LigB. LipL32 é a proteína majoritária da membrana da leptospira (MALMSTROM et al., 2009), altamente conservada em cepas patogênicas e ausente na espécie saprofítica *L. biflexa*, e altamente expressa durante a infecção (FLANNERY et al., 2001; GUERREIRO et al., 2001). É uma adesina, capaz de interagir com laminina, colágeno I e IV, e fibronectina plasmática (HAUK et al., 2008; HOKE et al., 2008). Liga-se ainda ao PLG que pode ser convertido em plasmina (VIEIRA et al., 2010). Todas essas características sugeriam um papel extremamente importante da LipL32 para a patogenia da leptospirose. Surpreendentemente, estudos mutagênicos demonstraram que essa proteína não é necessária nem para infecção nem para colonização de hospedeiros crônicos (MURRAY et al., 2009c).

O mesmo ocorreu para a proteína LigB. Uma proteína amplamente distribuída por cepas patogênicas de leptospira, com expressão aumentada em condições de infecção e capaz de interagir com laminina, fibronectina, colágenos I, III e IV, elastina, tropoelastina, fibrinogênio, C4BP, fator H, C3b e C4b, demonstrava potencial enorme para virulência da bactéria (CASTIBLANCO-VALENCIA et al.,

2012; CHOY et al., 2007, 2011, 2012; CRODA et al., 2007; LIN et al., 2009; MATSUNAGA et al., 2003). No entanto, mutantes para o gene *ligB* produzidos por recombinação homóloga não apresentaram atenuação ou perda de sua virulência (CRODA et al., 2008).

A leptospira, com sua biologia única e patogênese diversificada, ainda é um microrganismo enigmático que tem causado grandes prejuízos para a economia e sociedade do mundo todo. Desvendar seus mecanismos de patogenicidade é o primeiro passo para que métodos diagnósticos e profiláticos eficientes possam ser desenvolvidos. Tendo isso em consideração, o presente trabalho tem como objetivo principal caracterizar proteínas hipotéticas de *L. interrogans* com a finalidade de definir seus possíveis papéis na patogênese da leptospirose.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Bactérias

2.1.1 *Leptospira* spp.

Cepas patogênicas com virulência atenuada de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M-20), *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae (RGA), *L. interrogans* sorovar Canicola (Hond Utrecht IV), *L. interrogans* sorovar Pomona (Pomona), *L. interrogans* sorovar Hardjo (Hardjo-prajitno); *L. borgpetersenii* sorovar Whitticombi (Whitticombi); *L. kirschneri* sorovar Cynopteri (3522 CT). *L. kirschneri* sorovar Grippotyphosa (Moskva) e *L. noguchii* sorovar Panama (CZ214) foram empregadas nesse trabalho. Também foram utilizadas cepas patogênicas virulentas de *L. interrogans* sorovares Kennewicki (Pomona Fromm - LPF) e Copenhageni (Fiocruz L1-130), e a cepa saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc (Patoc 1).

As diversas leptospiros foram cultivadas a 28 °C, em condições aeróbicas, em meio líquido EMJH modificado (Difco®, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) (TURNER, 1970). Como o tempo de geração das leptospiros varia em torno de 6 a 8 horas as subculturas são mantidas por cerca de 14 dias antes de serem novamente subcultivadas. A recuperação da virulência é realizada em hamsters e o cultivo obtido a partir do isolamento primário é mantido por até 13 semanas. As culturas e os hamsters infectados para obtenção de cepas virulentas são mantidos rotineiramente no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo, Brasil.

2.1.2 *Escherichia coli*

Bactérias da linhagem *E. coli* DH5αTM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foram utilizadas para subclonagem dos produtos de PCR no vetor pGEM-T Easy (Promega, Prodimol, MG, Brasil) e clonagem no vetor de expressão pAE (RAMOS et al., 2004).

As linhagens de *E. coli* BL21-SI (Salt Induced) (Invitrogen), BL21(DE3) (Invitrogen), BL21 StarTM(DE3)pLysS (Invitrogen) e C43(DE3) (Avidis, Saint-Beazure, França) foram utilizadas no estudo da expressão das proteínas recombinantes.

2.2 Vetores de clonagem e expressão

O vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega) (Figura 2) é um vetor comercial resultante da digestão do vetor pGEM-5Zf (+) com a *EcoR* V e adição de timidinas em suas extremidades 3'. Esse vetor possui promotores T7 e SP6, um gene de resistência à ampicilina e um sítio de múltipla clonagem que interrompe a região codificadora do peptídeo- α da enzima β -galactosidase, a qual é capaz de degradar o substrato X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo) tornando-o azul. A interrupção da expressão desse peptídeo permite a seleção dos clones recombinantes em placas de cultura contendo IPTG (isopropil- β -tiogalactopiranosídeo) e X-Gal pela coloração azul/branco (PROMEGA..., 2010).

Figura 2 – Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy e suas características

Abreviaturas: ori – origem de replicação. Amp^r – gene de resistência à ampicilina. lacZ- gene para metabolismo de lactose (β -galactosidase).

Fonte: PROMEGA... (2010)

O vetor de expressão pAE (RAMOS et al., 2004) (Figura 3) consiste numa modificação dos vetores pRSETA (Invitrogen) e pET3-His. Ele é constituído pelo promotor do fago T7 (*pT7*), portanto a expressão das proteínas recombinantes só ocorre na presença da enzima T7 RNA polimerase. Possui ainda uma sequência codificadora para 6 resíduos de histidina logo após o códon de iniciação, um sítio de múltipla clonagem e um gene de resistência à ampicilina.

Figura 3 – Mapa do vetor de expressão em *E. coli* pAE e suas características

Abreviaturas: P_{T7} – promotor. (HIS)_{6x} – sequência codificadora para 6 resíduos de histidina. RBS – sítio de ligação ao ribossomo. ATG – códon de iniciação. ori – origem de replicação. Term – região de terminação da transcrição (T7). Amp^R – gene de resistência à ampicilina.

Fonte: RAMOS et al. (2004)

2.3 Soros

Os soros de pacientes diagnosticados com leptospirose utilizados nesse estudo constituem sorotecas do Instituto Adolfo Lutz Central e da região de Santos e foram cedidos gentilmente pela Dra. Eliete C. Romero e Ivy de Jesus Alves, respectivamente.

Os soros de hamsters foram obtidos por meio de sangramento via plexo retro-orbital no 5º dia após infecção experimental por *L. interrogans* sorovar Kennewicki (LPF), quando os sintomas de leptospirose começaram a aparecer. A infecção foi confirmada pelo MAT.

2.4 Análises de bioinformática

Os genes foram selecionados a partir do genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni, disponível no servidor público *Leptospira* - Genome Project (2001) (NASCIMENTO et al., 2004b).

A predição da localização celular das proteínas foi analisada pelos programas PSORT (1999) (NAKAI; KANEHISA, 1991; NAKAI; HORTON, 1999) e CELLO (2006) (YU; LIN; HWANG, 2004; YU et al., 2006). Os programas LipoP (2011) (JUNCKER et al., 2003) e SignalP (2013) (BENDTSEN et al., 2004; NIELSEN et al., 1997) foram utilizados para avaliar a presença do sítio de lipidação ou

clivagem; e os programas SMART (2012) (LETUNIC; DOERKS; BORK, 2012; SCHULTZ et al., 1998) e PFAM (2013) (PUNTA et al., 2012) foram utilizados para verificar a presença de domínios proteicos funcionais ou estruturais conservados.

A análise da similaridade das sequências estudadas com a de outras espécies e sorovares de *Leptospira* foi realizada pela ferramenta BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL et al., 1990, 1997), utilizando um banco de dados de domínios conservados (MARCHLER-BAUER et al., 2009).

A filogenia das sequências codificadas pelos genes selecionados para o estudo foi realizada pelo programa de alinhamento múltiplo ClustalW2 (2013) (LARKIN et al., 2007).

As características físicas e químicas das proteínas preditas codificadas pelos genes em estudo foram avaliadas utilizando a ferramenta ProtParam (2005) (GASTEIGER, 2006).

2.5 Desenho dos oligonucleotídeos

Com auxílio do programa Generunner® (1994) um par de oligonucleotídeos para cada gene (“*Forward*” - F - e “*Reverse*” - R -) foi desenhado, sem a sequência do peptídeo sinal, de acordo com a sequência genômica da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (número de acesso ao GenBank: **AE016823**) (Quadro 3). Sítios de restrição para as enzimas *XhoI* e *HindIII* foram adicionados aos oligonucleotídeos desenhados para os genes LIC11009, LIC11975 e LIC13477; e sítios de restrição para as enzimas *BamHI* e *HindIII* foram adicionados aos oligonucleotídeos desenhados para os genes LIC11360 e LIC13011.

Quadro 3 – Sequências de oligonucleotídeos sintetizados a partir do genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

Gene ID	Oligonucleotídeo e Sítios de Restrição	TA	Amplicon
LIC11009	F: 5' <u>CTCGAGGA</u> AGGTTGGGCAGTAGTAAAATT 3' (<i>XhoI</i>) R: 5' <u>AAGCTTT</u> CACTTTTTCAAATCGGTATAAAC 3' (<i>HindIII</i>)	59 °C	648 pb
LIC11360	F: 5' <u>GGATCCGA</u> ACTTCCTTACTTTTCCCCTAAC 3' (<i>BamHI</i>) R: 5' <u>AAGCTTGA</u> ATGTTGACTAGAGGCATTTACT 3' (<i>HindIII</i>)	64 °C	602 pb
LIC11975	F: 5' <u>CTCGAGGA</u> ATGTAGCGGTGCGG 3' (<i>XhoI</i>) R: 5' <u>AAGCTTT</u> CATCCCAAAGATAATTCA 3' (<i>HindIII</i>)	51 °C	978 pb
LIC13011	F: 5' <u>GGATCC</u> TTTAAGGATTTTCTTTC 3' (<i>BamHI</i>) R: 5' <u>AAGCTTGA</u> AGACACTCCCTAATTG 3' (<i>HindIII</i>)	47 °C	916 pb
LIC13477	F: 5' <u>CTCGAGCA</u> AGAAATTGAGGAAAAAAC 3' (<i>XhoI</i>) R: 5' <u>AAGCTTTT</u> AAAATCTGTGTTTCGGC 3' (<i>HindIII</i>)	52 °C	1497 pb

Notas: Gene ID - identificação do gene no genoma *L. interrogans* sorovar Copenhageni (LIC). Sublinhado - sequências dos sítios de restrição correspondentes.

Abreviaturas em inglês: F - "forward". R - "reverse".

Abreviaturas em português: TA - temperatura de anelamento. pb - pares de base.

2.6 Extração de DNA de culturas de *Leptospira* spp.

A extração de DNA foi feita por fenol-clorofórmio, segundo metodologia descrita por Maloy (1989). Para isso, foram utilizados 3 mL de cultura de nove espécies patogênicas e uma saprofítica de *Leptospira* (Subseção 2.1.1).

As culturas com crescimento de 7 dias foram centrifugadas a 6000 rpm em temperatura ambiente por 20 minutos. Os meios de cultura foram descartados e os sedimentos bacterianos ressuspensos em 467 µL de tampão Tris—EDTA (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0). Em seguida foram adicionados 30 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 60 µg de proteinase K (Sigma – Aldrich, St. Louis, Mo., EUA), e a mistura foi homogeneizada. Após incubação de 1 hora a 37 °C, foi adicionado aos tubos volume igual de solução fenol-clorofórmio 1:1, e agitação vigorosa foi realizada para que todo o conteúdo dos tubos estivesse bem misturado. As soluções foram centrifugadas a 14000 rpm, em temperatura ambiente,

por 5 minutos. As fases aquosas (superiores) foram transferidas para novos tubos e a extração por solução fenol-clorofórmio foi repetida. Logo após, acrescentou-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e 0,6 volumes de isopropanol; as amostras foram misturadas por inversão para precipitação do DNA. Os tubos foram incubados a -20 °C por 1 hora e posteriormente centrifugados a 14000 rpm por 20 minutos (4 °C). Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos lavados com 1 mL de etanol 70% gelado. Após nova centrifugação por 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram ressuspensos em 50 µL de tampão Tris-EDTA. As amostras foram armazenadas a -20 °C.

A quantificação do DNA de cada cepa foi realizada por espectrofotometria a 260 e 280 nm.

2.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação dos genes foi realizada por PCR utilizando PCR *buffer*, 1,5 mM MgCl₂; 0,5 mM de cada oligonucleotídeo (F e R – Quadro 3); 0,25 mM desoxirribonucleotídeos (dNTPs); 1U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 100 ng de DNA genômico, conforme protocolo básico recomendado pelo fabricante. A reação foi realizada em termociclador, com desnaturação do DNA a 94 °C por 4 minutos; 35 ciclos de: 94 °C por 50 segundos, temperatura de anelamento por 50 segundos e 72 °C por 2 minutos; finalizando com 72 °C por 7 minutos. As temperaturas de anelamento, visualizadas no Quadro 3, foram determinadas de acordo com as temperaturas de *melting* (T_m) dos oligonucleotídeos estabelecidas pelo programa Generunner® (1994); médias delas (F e R) foram subtraídas em 5 °C.

Os produtos obtidos foram corados com GelRed™ (Biotium, Inc., Hayward, CA, EUA) e avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA).

2.8 Clonagem

Os *amplicons* obtidos do DNA genômico da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M-20) por PCR foram purificados, quantificados em espectrofotômetro, e utilizados para subclonagem no vetor pGEM-T Easy (Promega) realizando uma reação de ligação conforme as instruções do fabricante.

Aproximadamente 50 ng do produto de ligação foram utilizados para transformar por choque térmico *E. coli* DH5 α (Invitrogen) tornadas previamente competentes pelo método descrito por Hanahan (1983). Resumidamente, bactérias competentes foram incubadas por 30 minutos com o produto da ligação no gelo. Em seguida elas foram submetidas a um choque térmico por 2 minutos a 42 °C e 5 minutos a 4 °C. Depois foram adicionados 350 μ L de meio de cultura Luria Bertani – LB (0,5% extrato de levedura, 1% triptona e 1% NaCl). Após 1 hora de incubação a 37 °C essa suspensão bacteriana foi plaqueada em meio LB sólido (água 1,5%) contendo 100 μ g/mL de ampicilina (LB/Amp), 100 mM de IPTG e 50 mg/mL de X-Gal; as colônias positivas foram selecionadas, após 16 horas de incubação a 37 °C, com base na coloração azul/branco.

Duas colônias presumivelmente positivas de cada transformação (colônias brancas) foram inoculadas em 6 mL de meio LB/Amp e incubadas a 37 °C, por 16 horas, sob agitação. O DNA plasmidial foi extraído utilizando kit comercial (Plasmid prepmini spin - GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, EUA) e em seguida digerido com enzimas de restrição *XhoI/HindIII* (para os genes LIC11009, LIC11975 e LIC13477) ou *BamHI/HindIII* (para os genes LIC11360 e LIC13011). A presença ou ausência do inserto foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRedTM (Biotium).

Os insertos removidos do vetor pGEM-T Easy (Promega) foram transferidos para o vetor de expressão em *E. coli* pAE (RAMOS et al., 2004) previamente digerido com as mesmas enzimas utilizadas na obtenção dos respectivos insertos. A reação de ligação do inserto com o vetor foi realizada em duas etapas; primeiro inserto e vetor em razão 5:1 foram incubados por 5 minutos a 45 °C, em seguida foram adicionados 5 U da enzima T4 DNA ligase (GE Healthcare) e a mistura foi incubada por mais 2 horas a 37 °C. Uma reação controle foi realizada em paralelo omitindo-se o inserto (controle negativo).

Dado o tempo da ligação, as misturas foram utilizadas para transformar bactérias competentes *E. coli* DH5 α (Invitrogen), que foram plaqueadas em meio sólido LB/Amp e incubadas por 16 horas a 37 °C. As colônias selecionadas, tanto da placa controle como da placa com amostra, foram inoculadas em 4 mL de meio LB/Amp e incubadas por 16 horas, a 37 °C, sob agitação. A seleção dos clones positivos por extração plasmidial rápida com fenol-clorofórmio foi realizada utilizando 300 μ L de cada inóculo. Para isso, os inóculos foram centrifugados por 3 minutos a

12000 rpm. O sedimento bacteriano foi ressuspensionado em 50 µL de água deionizada, e em seguida acrescido de 20 µL de Ficoll dye 10X contendo GelRed™ (Biotium) e 28 µL de solução fenol-clorofórmio 1:1. Essa mistura foi vigorosamente homogeneizada e por fim centrifugada por 3 minutos a 12000 rpm. A fase superior obtida foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% para seleção dos clones positivos.

A digestão do plasmídeo recombinante pAE/LIC com as enzimas de restrição correspondentes foi realizada a fim de confirmar a presença do inserto.

2.9 Sequenciamento automático

O sequenciamento dos clones selecionados pela extração plasmidial por fenol-clorofórmio foi realizado pelo método de terminação da cadeia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Foram utilizados oligonucleotídeos sintéticos desenhados para se anelarem ao vetor pAE (RAMOS et al., 2004) na região promotora T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG3' e 5'TATGCTAGTTATTGCTCAG3'), e um sequenciador automático do modelo *ABI PRISM_(R) 3100 Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA).

A reação de amplificação foi realizada de acordo com as recomendações da Applied Biosystems, empregando 500 ng de DNA molde, 3,2 pmoles de oligonucleotídeos e 2 µL do tampão *BigDye®* (PE Applied Biosystems), que contém ddNTPs (didesoxirribonucleotídeos) marcados com fluoróforos, dNTPs e *Taq* DNA polimerase, em volume final de 20 µL. A reação foi realizada em termociclador seguindo a rotina de 40 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 52 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Os cromatogramas obtidos foram analisados com auxílio das ferramentas Chromas (2005) e Blast2 (ALTSCHUL et al., 1990; ALTSCHUL et al., 1997).

2.10 Teste de expressão das proteínas recombinantes

Para avaliar a melhor condição em que as proteínas poderiam ser expressas foi realizado preliminarmente um estudo de indução empregando *E. coli* BL21-SI, BL21(DE3), BL21 Star™(DE3)pLysS (Invitrogen) e C43(DE3) (Avidis). Essas bactérias, tornadas previamente competentes (HANAHAH, 1983), foram

transformadas com os plasmídeos recombinantes e cultivadas, por 16 horas, em 3 mL de meio de cultura e temperatura apropriados, conforme descrito no Quadro 4.

Quadro 4 – Condições ótimas de cultivo para diferentes linhagens de *E. coli*

Linhagem Bacteriana	Meio de Cultivo	Temperatura Ótima
BL21-SI	2YT/ON	30 °C
BL21(DE3)	LB/Amp	37 °C
C43(DE3)	LB/Amp	37 °C
BL21 StarTM(DE3)pLysS	LB/Amp/Clor	37 °C

Notas: 2YT/ON - 1% extrato de levedura, 1,6% triptona (ausência de NaCl). LB - Luria Bertani (0,5% extrato de levedura, 1% triptona e 1% NaCl). LB/Amp - LB contendo 100 µg/mL ampicilina. LB/Amp/Clor - LB/Amp contendo 100 µg/mL de cloranfenicol.

As culturas saturadas foram diluídas (1:25) em novo meio e as bactérias foram cultivadas até a fase log (Densidade Óptica - DO_{600nm} 0,5-0,7) para indução da expressão gênica, por um período de 3 horas, com diferentes concentrações de indutores: *E. coli* BL21-SI (Invitrogen) – 75; 150 e 300 mM NaCl; *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen), C43(DE3) (Avidis) e BL21 StarTM(DE3)pLysS (Invitrogen) - 0,01; 0,1 e 1 mM IPTG. Alíquotas de culturas coletadas antes e após 3 horas da adição dos indutores foram centrifugadas, a 15000 rpm, por 15 minutos, e os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em tampão de lise (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 200 µg/mL lisozima; 2 mM PMSF (fenilmetilsulfonylfluor) e 1% Triton X-100) para que fossem lisados, em banho de gelo, por sonicação a 60 Hz. Após nova centrifugação os sedimentos formados foram ressuspensos em tampão de desnaturação (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 8 M ureia e 5 mM β-mercaptoetanol). Alíquotas do sobrenadante do lisado e do sedimento solubilizado foram analisadas em eletroforese em gel de poliácridamida 15% contendo SDS (SDS-PAGE).

Ao serem escolhidas as cepas e as condições mais adequadas, as proteínas recombinantes foram expressas em maior escala para posterior purificação das mesmas.

2.11 Imunoblotting para detecção de resíduos de histidina

Extratos de *E. coli* selvagens, transformadas e cultivadas sem a presença de indutor, e o sobrenadante e sedimento bacteriano resultantes da sonicação das

bactérias cultivadas na presença do indutor com melhores condições aparentes de expressão, foram separados por SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, GE Healthcare) em sistema semiúmido por 2 horas a 0,8 mA por cm². A eficiência da transferência foi avaliada por meio de coloração com *Ponceau S* (Sigma – Aldrich).

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas por 16 horas, a 4 °C, com 10 mL de tampão fosfato-salina acrescido de 0,05% Tween-20 (PBS-T) e 10% de leite desnatado (PBS-T/Leite). Em seguida foram lavadas três vezes, por 7 minutos, com PBS-T e incubadas por 2 horas, a temperatura ambiente, sob agitação, com anticorpo monoclonal de camundongo antipoli-histidina (Sigma - Aldrich) diluído 1:1000 em PBS-T/Leite. Após serem lavadas três vezes com PBS-T, as membranas foram incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação, com anti-IgG de camundongo produzido em coelho conjugado com peroxidase (Sigma - Aldrich) na diluição de 1:5000. As membranas foram lavadas três vezes com PBS-T e as frações foram detectadas em filmes de raio-X (Kodak) expostos às membranas por tempos curtos (1-5 minutos) utilizando o kit ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare).

2.12 Purificação e diálise das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade ao metal empregando a resina *Chelating Sepharose* (GE Healthcare) previamente carregada com 300 mM NiSO₄. Todas as proteínas foram solubilizadas com 8 M ureia e diferentes estratégias foram utilizadas para a remoção desse agente desnaturante.

Para a purificação da rLIC11009 e rLIC13477 foram utilizados, respectivamente, 200 mL de cultura de *E. coli* BL21-SI (Invitrogen) e C43(DE3) (Avidis), enquanto que para a purificação da rLIC11975 foram utilizados 400 mL de cultura de *E. coli* BL21-SI (Invitrogen). Para a purificação da rLIC13011 somente 50 mL de cultura de BL21(DE3) (Invitrogen) foram empregados. A remoção do agente desnaturante das proteínas recombinantes foi realizada por meio de sucessivas lavagens com tampão de renaturação contendo 100 mM Tris-HCl/Tris (pH diferente do ponto isoelétrico da proteína), 500 mM NaCl e concentrações decrescentes de ureia. Em seguida foram realizadas 4 lavagens com 30 mL do mesmo tampão sem

ureia e com concentrações crescentes de imidazol (5, 20, 40 e 60 mM). Por fim a proteína foi eluída com 1 M de imidazol. Frações de 1,5 mL foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE.

Para purificação da rLIC11360 foram utilizados 200 mL de cultura de *E. coli* BL21-SI (Invitrogen). A proteína desnaturada foi diluída por gotejamento lento (0,1 mL/min), sob agitação, em 2 L de tampão contendo 100 mM Tris (pH 12,0) e 500 mM NaCl. Em seguida, foi adsorvida na resina, previamente equilibrada com o mesmo tampão de diluição, e submetida às sucessivas lavagens com 30 mL de solução de diluição acrescida de concentrações crescentes de imidazol (5, 20, 40 e 60 mM). A proteína recombinante foi eluída com 1 M de imidazol e frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE.

As alíquotas resultantes da eluição que continham a proteína recombinante foram coletadas em membranas semipermeáveis com poros de 12000 Da para realização de diálise.

As proteínas recombinantes rLIC11360 e rLIC13011 foram dialisadas, a 4 °C, contra tampão contendo 100 mM Tris (pH 12,0), 500 mM NaCl e 0,1% glicina, por cerca de 4 horas, sob agitação, e em seguida armazenadas em alíquotas de 500 µL a -80 °C.

A proteína rLIC11975 foi dialisada contra tampão contendo 100 mM Tris (pH 12,0), 500 mM NaCl e 0,1% glicina, por cerca de 8 horas, sob agitação, a 4 °C. Foram realizadas duas trocas desse tampão durante esse intervalo de tempo. Em seguida essa proteína recombinante foi dialisada contra tampão contendo 10 mM Tris (pH 12,0), 50 mM NaCl e 0,1% glicina, por 4 horas, sob agitação, a 4 °C, e enfim armazenada em alíquotas de 1 mL a -20 °C.

A rLIC11009 foi dialisada contra tampão contendo 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl e 0,1% glicina, por cerca de 8 horas, sob agitação, a 4 °C. Foram realizadas duas trocas desse tampão durante esse intervalo de tempo, antes de ser dialisada contra tampão PBS (pH 7,4) contendo 0,1% glicina. Por fim, alíquotas de 1 mL foram coletadas e armazenadas a -20 °C.

A proteína rLIC13477 foi armazenada no tampão de eluição, em alíquotas de 1 mL, a -20 °C.

As concentrações das proteínas recombinantes foram estimadas em SDS-PAGE por comparação com massas conhecidas de BSA (albumina do soro bovino) utilizando análise densitométrica do software GelQuant (2003).

2.13 Dicroísmo circular (CD)

Depois de purificadas, as proteínas rLIC11009 e rLIC11975 foram dialisadas contra tampão fosfato de sódio (pH 7,4), enquanto que a rLIC11360 foi dialisada contra tampão 10 mM Tris (pH 12,0).

As espectroscopias circulares foram captadas a 20 °C em um espectropolarímetro de modelo Jasco J-810 (Japan Spectroscopic, Tóquio, Japão). O espectro foi medido usando uma cubeta de 1 mm de caminho óptico em intervalos de 0,5 nm/seg, e expresso em termos de elipticidade molar residual:

$$[\Phi] = \Phi \text{ (deg)} \times 100 \times M \text{ (Da)} / C \text{ (mg/mL)} \times l \text{ (cm)} \times n$$

em que Φ é elipticidade, M é a massa molecular da proteína, C é a concentração da proteína, l é o caminho óptico e n é o número de resíduos da proteína. Os espectros foram apresentados como uma média de cinco escaneamentos em intervalos de 185 a 260 nm e submetidos a uma análise no programa K2D3, que calcula o conteúdo de estrutura secundária da proteína a partir dos dados experimentais de elipticidade obtidos (LOUIS-JEUNE; ANDRADE-NAVARRO; PEREZ-IRATXETA, 2012).

2.14 Imunização de camundongos

Fêmeas BALB/C com 6-8 semanas de vida foram divididas em grupos de cinco animais. Cada grupo foi imunizado subcutaneamente com 10 µg de proteína recombinante ou PBS, como controle negativo, em suspensão contendo *Alhydrogel* (2% Al(OH)₃, Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca) como adjuvante. Foram aplicadas 3 doses com intervalos de 15 dias; quinze dias após cada dose os animais foram sangrados via plexo retro-orbital. Os sangues obtidos foram centrifugados por 5 minutos a 5000 rpm e os soros coletados foram armazenados a -20 °C.

Quinze dias após a última imunização os camundongos foram sacrificados em câmara de CO₂, higienizados com etanol 70% e tiveram seus baços removidos por incisão na lateral esquerda para cultivo dos esplenócitos.

2.15 Ensaio de linfoproliferação e liberação de citocinas

Os baços removidos dos camundongos após a última imunização foram macerados em meio de cultura RPMI gelado (*Roswell Park Memorial Institute*) contendo 2 mM L-glutamina, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 50 µg/mL de gentamicina. Em seguida, as hemácias foram lisadas em água gelada e os esplenócitos foram ressuspensos em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino. Os esplenócitos foram avaliados quanto à sua viabilidade por meio da coloração de *Trypan blue* 0,4% (Invitrogen) e posteriormente distribuídos (5×10^6 células/poço) em placas de cultura de células com 96 poços (Costar - Corning, Tewksbury, MA, EUA). Esses esplenócitos foram estimulados com 5 µg/mL de concanavalina A (ConA – Sigma – Aldrich), ou 5 µg/mL de proteína recombinante, ou 2×10^8 leptospiras vivas (*L. interrogans* sorovar Copenhageni M-20). Esplenócitos incubados somente com meio RPMI foram utilizados como controle negativo. O cultivo das células foi realizado por 48 horas, a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. Após esse período, a proliferação das células foi determinada em função da síntese de DNA de acordo com a quantidade incorporada de bromodesoxiuridina (BrdU) utilizando o kit colorimétrico comercial *Cell Proliferation ELISA, BrdU* (Roche Diagnostic, Indianápolis, IN).

Para avaliar a liberação de citocinas pelos esplenócitos extraídos dos camundongos as células foram cultivadas e estimuladas em placas de cultura de 24 poços nas mesmas condições citadas acima. Após esse período, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm (4 °C) e o sobrenadante foi coletado para mensuração das citocinas liberadas. Níveis de interleucina-4 (IL-4), IL-10, IL-12, interferon gama (IFN-γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) foram avaliados por ELISA utilizando kits comerciais e as respectivas recomendações do fabricante (PeproTech, Colonia Narvarte, México). Os resultados foram expressos em pg/mL, em função de uma curva padrão realizada com amostras fornecidas pelo próprio kit.

2.16 Detecção de imunoglobulinas

2.16.1 ELISA para detectar IgG em soros de camundongos

A presença de anticorpos policlonais nos soros de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes foi avaliada por diluição seriada. Para isso, 250 ng/poço de proteína recombinante diluída em tampão carbonato 0,1 M (pH 9,6) foram adsorvidas em placa de microdiluição (Corning) e incubadas, por 16 horas, a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T, e bloqueadas por 2 horas, a 37 °C, com 200 µL/poço de PBS-T/Leite.

A diluição seriada dos soros foi feita em 70 µL da mesma solução de bloqueio acrescida de 25% de extrato de *E. coli* da mesma linhagem utilizada para expressão das proteínas recombinantes, iniciando em 1:200. Esses soros foram incubados por 1 hora nesse tampão, antes de serem incubados com os respectivos antígenos, para que fossem adsorvidos os anticorpos inespecíficos contra proteínas de *E. coli*.

Os soros foram incubados por 1 hora, a temperatura ambiente, com as proteínas recombinantes. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T, e incubadas por mais 1 hora, a temperatura ambiente, com 50 µL/poço de solução bloqueio contendo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma - Aldrich) na diluição 1:5000. Em seguida, as placas foram lavadas e a ligação antígeno/anticorpo foi demonstrada indiretamente pela reação da peroxidase com o substrato OPD (cloridrato de o-fenilenodiamina, Sigma - Aldrich), diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 (1 mg/mL) contendo 1 µL/mL H₂O₂ (100 µL/poço). A reação foi interrompida após 15 minutos com 50 µL/poço de H₂SO₄ 4 N e sua intensidade foi analisada por espectrofotometria a 492 nm (DO_{492nm}). O título de anticorpos foi considerado a maior diluição dos soros correspondente a uma DO_{492nm} maior ou igual a 0,1.

2.16.2 ELISA para detectar IgG em soros de humanos e de hamsters

A detecção de IgG tanto no soro de pacientes diagnosticados com leptospirose, quanto no soro de hamsters infectados experimentalmente, foi

realizada por ELISA de maneira semelhante à detecção de IgG no soro de camundongos.

Os antígenos adsorvidos em placas de microdiluição foram incubados com soros, em diluição 1:200, por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida as placas foram lavadas e incubadas, por 1 hora a temperatura ambiente, com 50 µL/poço de anti-IgG de humano (Sigma - Aldrich) ou de hamster (KPL - Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland, EUA) conjugado com peroxidase e diluído 1:5000 em PBS-T/Leite. A reação antígeno/anticorpo foi demonstrada como descrito anteriormente a 492 nm.

Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism (1999) e o valor de *cutoff* para cada proteína recombinante foi definido como o percentil de 96º da média dos valores de absorbância de dois *pools* de soros humanos normais comerciais (Sigma – Aldrich e Complement Technology, INC. Tyler, TX, EUA), como descrito por Flannery et al. (2001). Os valores de *cutoff* das proteínas em relação aos soros dos hamsters infectados foram calculados com base em quatro amostras de animais não infectados. Foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentaram valores maiores do que o estabelecido pelo *cutoff*.

2.16.3 Imunoblotting para detectar IgG em soros de camundongos

O imunoblotting para detecção de anticorpos produzidos contra as proteínas recombinantes foi realizado de maneira semelhante ao realizado para detecção dos resíduos de histidina.

Vinte microlitros de cada proteína recombinante a ser avaliada foram aplicados em SDS-PAGE e transferidos por 90 minutos para membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas, a 4 °C, por 16 horas, com PBS-T/Leite e em seguida lavadas 3 vezes, por 10 minutos, com PBS-T. Antissoros produzidos em camundongo anti-rLIC11009, anti-rLIC11360 e anti-rLIC11975 foram diluídos 1:5000 em PBS-T/Leite e adsorvidos em extrato de *E. coli* por 1 hora a temperatura ambiente antes de serem incubados com as membranas de nitrocelulose por 90 minutos. As membranas foram lavadas novamente com PBS-T e incubadas com anti-IgG de camundongo produzido em coelho conjugado com peroxidase (Sigma - Aldrich), diluído 1:5000 em PBS-T/Leite, por 1 hora a

temperatura ambiente, sob agitação. As frações foram detectadas utilizando kit ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) em filmes de raio-X (Kodak).

2.17 Estudos de expressão e localização celular

2.17.1 Extração de RNA e transcrição reversa (RT-PCR)

Para extração do RNA foram utilizados 20 mL de cultura das mesmas cepas de leptospira utilizadas na extração de DNA (Subseção 2.6), mais as cepas patogênicas virulentas de *L. interrogans* sorovares Kennewicki (LPF) e Copenhageni (Fiocruz L1-130). Também foram extraídos RNAs de *L. borgpetersenii* Whitticombi, *L. kirschneri* Cynopteri e Grippotyphosa, *L. noguchii* Panama e *L. biflexa* Patoc cultivadas por 16 horas a 37 ou 39 °C, ou em meio suplementado com 120 mM de NaCl na temperatura de 28 °C.

Após 5 dias de cultivo, as leptospiras foram centrifugadas, a 4 °C, por 30 minutos, em rotação de 6000 rpm; o meio de cultura foi descartado e as bactérias foram ressuspensas em 2 mL de Trizol (Invitrogen). Depois de 10 minutos de centrifugação a 12000 rpm (4 °C) foram adicionados 400 µL de clorofórmio. Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e deixados em repouso por 3 minutos, a temperatura ambiente, antes de serem centrifugados por mais 15 minutos. As fases aquosas foram transferidas para novos microtubos e 1 mL de isopropanol gelado foi acrescentado. Os tubos foram invertidos 6 vezes e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Após nova centrifugação, por 10 minutos, a 12000 rpm (4 °C) o precipitado foi ressuspensado em 1 mL de etanol 75% gelado. A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada por 5 minutos a 12000 rpm (4 °C). O precipitado foi seco em papel absorvente, por 10 minutos a temperatura ambiente, e por fim ressuspensado em 40 µL de água livre de RNase (DEPC – Invitrogen).

Os RNAs obtidos foram quantificados por espectrofotometria a 260 e 280 nm, e a relação das duas absorbâncias ($A_{260/280}$) foi utilizada para avaliar a sua pureza.

Dois microgramas de cada RNA foram tratados em três etapas com a enzima DNase I utilizando o kit *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen). Na primeira etapa foram utilizados 1 µL de tampão, fornecido pelo kit, e 1 µL da enzima, para

uma reação final de 10 μ L e os tubos foram incubados por 15 minutos a 20 °C. Na segunda etapa foram adicionados 0,5 μ L de tampão, 0,5 μ L da enzima e 4 μ L de água DEPC e as amostras foram incubadas por mais 15 minutos a 20 °C. Esse processo foi repetido mais uma vez e em seguida foram adicionados 2 μ L de EDTA 25 mM. As amostras finalmente foram aquecidas por 10 minutos a 65 °C e divididas em duas frações para realização da transcrição reversa.

A RT-PCR foi realizada utilizando o kit comercial *Superscript® III First Strand* (Invitrogen). Em cada uma das amostras foram adicionados 25 ng de hexâmeros randômicos e 1 mM de dNTPs. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65 °C e 1 minuto a 4 °C. Em seguida foram acrescentados em uma das frações das amostras 5 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 40 U de *RNase OUT*, 200 U *SuperScript III RT* e tampão fornecido pelo próprio kit, para uma reação com volume final de 22 μ L (RT+). Nas outras frações das amostras foi adicionado água no lugar da *SuperScript III RT*, sendo utilizadas como controles de contaminação genômica (RT-). Todas as amostras foram incubadas em termociclador por 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 50 °C, 5 minutos a 85 °C e 5 minutos a 4 °C. As amostras foram tratadas com 1 U de *RNase H* por 20 minutos a 37 °C e armazenadas a -20 °C.

2.17.2 Real time RT-PCR (RT-qPCR)

A RT-qPCR foi realizada no aparelho “Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System” utilizando o corante SYBR Green I para detectar a formação dos produtos da reação. Como o SYBR Green I se liga a qualquer DNA dupla-fita, inclusive aos produtos não específicos da reação, foram realizadas padronizações nas concentrações de oligonucleotídeos e cDNAs para a obtenção de um resultado mais confiável.

Uma concentração ótima de oligonucleotídeo consiste na sua quantidade mínima capaz de produzir o mais baixo C_T (ciclo *threshold*) e mais elevado ΔR_n (fluorescência), sem que ocorram ligações inespecíficas e formação de dímeros (VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). Os oligonucleotídeos foram desenhados pelo programa “Primer Express™ software” (Applied Biosystems) tendo como base o genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Quadro 5). Para encontrar a concentração ótima de cada par, foi realizada uma reação de qPCR utilizando 50 ng de DNA genômico da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M-20) e

três concentrações distintas de cada oligonucleotídeo (300, 150 e 50 nM), como recomendado pela Applied Biosystems. De acordo com os resultados obtidos foi determinado que a concentração dos três pares de oligonucleotídeos a ser utilizada é de 300 nM (Apêndice B).

Quadro 5 – Sequências de oligonucleotídeos sintetizados para avaliação da expressão gênica

Gene ID	Oligonucleotídeo	Amplicon
16S	F: 5' CACGAAAGCGTGGGTAGTGA 3' R: 5' CAACGTTTAGGGCGTGGATTA 3'	60 pb
LIC11009	F: 5' TCCGTCGCTTTTGCAACTG 3' R: 5' CCGCCTGCTGGAGATTTATAAT 3'	77 pb
LIC11360	F: 5' CGGTACATCATTTTGATTCCATTTT 3' R: 5' CTGGGTTTCATGTTTCGTTTCTGA 3'	116 pb
LIC11975	F: 5' CCGCGGGTTTACCTATAGATTTT 3' R: 5' GGCAAGATTTCCTCGTTCGAA 3'	62 pb

Notas: Gene ID - identificação do gene no genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Abreviaturas (em inglês): F - “forward”. R - “reverse”. pb - pares de base.

A padronização da quantidade de cDNA garante que os resultados obtidos estejam dentro de uma faixa linear, ou seja, mesmo alvos com baixos níveis de expressão possam ser detectados. Essa padronização foi feita por meio de curvas padrão, que permitem também calcular a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos, necessária para a validação do método de quantificação relativa C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$). Foram feitas diluições de 4 ou 5 logs utilizando cDNA da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M-20). Os valores de C_T obtidos para cada gene foram analisados por meio de um gráfico de regressão linear e a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos foi calculada com base na seguinte fórmula:

$$E = (10^{(-1/slope)} - 1) \times 100$$

em que E é a eficiência da amplificação e *slope* é o valor da inclinação da reta gerada pelo gráfico. Foram toleradas diferenças de até 10% entre as eficiências de amplificação dos diversos pares de oligonucleotídeos para que o método $\Delta\Delta C_T$ fosse utilizado (Apêndice C). Os valores de C_T também permitiram avaliar a precisão do ensaio (desvio padrão de $C_T < 0,3$ e $R^2 > 0,99$).

Dessa forma, cada reação foi preparada em volume de 25 μ L empregando 25 ng de cDNA, 300 nM de cada oligonucleotídeo (“F” e “R”) e 12,5 μ L de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), conforme recomendado pelo

fabricante. Todas as reações foram realizadas em triplicata em placas ópticas de 96 poços. Controle negativo utilizando todos os reagentes exceto o cDNA foi realizado em paralelo a fim de excluir uma possível contaminação (NTC – *no template control*). As seguintes condições térmicas foram aplicadas: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de: (a) 95 °C por 15 segundos, (b) 60 °C por 30 segundos. Curva de dissociação foi obtida após cada reação por meio de aquecimento dos produtos da PCR a 60 °C e 95 °C, a fim de garantir a especificidade dos produtos da reação.

A comparação da expressão de cada gene nos diversos sorovares de leptospira foi realizada pelo método de quantificação relativa $\Delta\Delta C_T$. Esse método utiliza a fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (*fold change* relativo) para comparar o nível de expressão em diferentes amostras, sendo nesse caso:

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T\text{lepto}} - C_{T16S}) - (C_{T\text{Cop}} - C_{T16S})$$

em que $C_{T\text{lepto}}$ = média do ciclo de amplificação do gene em qualquer leptospira diferente da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M-20); C_{T16S} = média do ciclo de amplificação do gene endógeno 16S, e $C_{T\text{Cop}}$ = média do ciclo de amplificação do gene na *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M-20) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

2.17.3 Imunoblotting para detecção de proteínas

A detecção das proteínas nativas correspondentes aos genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 em diferentes sorovares de *Leptospira* foi realizada utilizando antissoro produzido em camundongos contra as respectivas proteínas recombinantes por meio da técnica de imunoblotting, de maneira semelhante à realizada para detecção das proteínas recombinantes.

Para realizar esse ensaio foram obtidos extratos de 10 sorovares de *Leptospira* a partir de 50 mL de cultura com 10 dias de cultivo. Essas culturas foram centrifugadas por 20 minutos a 6000 rpm, lavadas três vezes com 30 mL de PBS acrescido de 5 mM $MgCl_2$, e centrifugadas por mais 10 minutos a 6000 rpm (4 °C). Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 200 μ L de PBS acrescido de 9% SDS e separados por SDS-PAGE, antes de serem transferidos, por 3 horas, para uma membrana de nitrocelulose.

Em seguida, a membrana foi bloqueada por 16 horas, a 4 °C, com 10 mL de PBS-T/Leite, e depois incubada por 3 horas, a temperatura ambiente, sob agitação, com antissoro de camundongo contra as proteínas em concentração 1:50. As

membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação, com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma - Aldrich) diluído 1:5000 em PBS-T/Leite. A detecção das frações foi feita utilizando o kit ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) em 8 exposições de 1 minuto no equipamento GelLogic 2200 Pro (Carestream Health, Inc., Rochester, Nova York, EUA).

2.17.4 Ensaio de digestão com proteinase K (PK)

A digestão enzimática foi realizada conforme descrito por Oliveira et al. (2010), com algumas modificações. Resumidamente, para cada tratamento, 5 mL de cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M-20) ($\sim 10^8$ células/mL), cultivadas por 7 dias a 28 °C, foram centrifugadas a 6000 rpm, por 10 minutos, a temperatura ambiente. O sedimento foi gentilmente lavado com PBS contendo 50 mM NaCl (PBS *low salt* – PBS *ls*) e ressuspendido em 5 mL de tampão de proteólise (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM CaCl₂) contendo 25 µg/mL de PK (Sigma - Aldrich). As alíquotas foram incubadas a 37 °C sob agitação de 70 rpm, coletadas nos tempos 0, 30, 60, 120 e 240 minutos, e 100 mM de PMSF foram adicionados para interromper a atividade da PK. Em seguida as alíquotas foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos, lavadas duas vezes com PBS *ls* e ressuspendidas nesse mesmo tampão.

Placas de microdiluição com 96 poços (Corning) foram revestidas com aproximadamente 10^7 bactérias/poço e incubadas a temperatura ambiente por 16 horas. As placas foram lavadas três vezes com PBS *ls* e bloqueadas por 2 horas, a 37 °C, com PBS *ls* contendo 5% de leite desnatado e 1% de BSA. Em seguida as placas foram incubadas por 2 horas, a 37 °C, com antissoro policlonal produzido em camundongos contra rLIC11009, rLIC11360, rLIC11975, e LipL32 ou DnaK como controles positivo e negativo, respectivamente (STAMM et al., 1991; HAAKE et al., 2000) em diluição na qual a DO_{492nm} fosse igual a 1,0. As placas foram lavadas três vezes com PBS *ls* e incubadas por 1 hora, a 37 °C, com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:5000 em PBS *ls*. Enfim, os poços foram lavados três vezes com PBS *ls* e a reação enzimática foi revelada após adição de OPD, como descrito acima. A intensidade da reação foi analisada por espectrofotometria em comprimento de onda de 492 nm.

Os valores de DO obtidos foram subtraídos dos brancos, que contém toda a mistura da reação exceto os antissoros contra as proteínas recombinantes. Para a análise estatística a reação dos antissoros policlonais contra as proteínas no tempo de incubação de 0 hora foi comparada com as outras incubações pelo teste *t* de Student bicaudal.

2.17.5 Imunofluorescência (IF)

Culturas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M-20) foram centrifugadas por 15 minutos a 6000 rpm. O sedimento bacteriano foi lavado 3 vezes com PBS /s e ressuspensionado em 200 µL do mesmo tampão. Foram utilizadas cerca de 10^7 leptospiros por amostra. As bactérias foram transferidas para microtubos previamente bloqueados com 5% BSA e fixadas com paraformaldeído 2% por 40 minutos, a 30 °C, sob leve agitação. Em seguida foram centrifugadas, por 5 minutos, a 6000 rpm e bloqueadas, por 90 minutos, com 200 µL de PBS /s contendo 5% de BSA. Após nova centrifugação as leptospiros foram incubadas com antissoro antiproteína diluído 1:50 em solução de bloqueio. Antissoros produzidos contra LipL32 e DnaK foram utilizados como controles positivo e negativo, como mencionado acima. Adicionalmente, antissoro de animais inoculados com PBS também foi utilizado como controle negativo. As bactérias foram lavadas com PBS /s acrescido de 1% BSA e incubadas, a 30 °C, com anti-IgG de camundongo produzido em cabra e conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma - Aldrich) diluído 1:50 em solução de bloqueio. Depois de 45 minutos o sedimento bacteriano foi lavado duas vezes com PBS /s e 1% BSA, e uma vez com água destilada. Por fim as bactérias foram ressuspensionadas em 50 µL de PBS /s contendo 0,03 µg de iodeto de propídeo (IP – Sigma – Aldrich)/µL de *antifade*.

As lâminas foram examinadas em um microscópio de fluorescência confocal do modelo LSM 510 META (Carl Zeiss Inc., Alemanha) que se encontra sob responsabilidade do Departamento de Parasitologia do Instituto Butantan (São Paulo, SP).

2.18 Ensaio de interação das proteínas recombinantes com componentes do plasma e da MEC

A interação das proteínas recombinantes com componentes da MEC e do plasma foi avaliada por ELISA de acordo com o protocolo previamente publicado (ATZINGEN et al., 2008). Em resumo, 1 µg de laminina, colágeno tipo I e IV, fibronectina celular e plasmática, elastina, vitronectina (Sigma – Aldrich), PLG humano, complemento, fator H (Calbiochem), fibrinogênio (Sigma – Aldrich), C4BP (Complement Technology) e fragmentos proteolíticos da fibronectina plasmática (30 kDa – F30, 45 kDa – F45, 70 kDa – F70, Sigma – Aldrich) foram adsorvidos em placas de microdiluição por 3 horas a 37 °C. BSA, gelatina e fetuína foram utilizadas como controles negativos. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS-T e bloqueados com 200 µL de PBS-T/Leite por 1 hora a 37 °C, seguido de incubação a 4 °C por 16 horas. A solução de bloqueio foi descartada e em cada poço foram adicionados 100 µL de PBS contendo 1 µg de cada proteína recombinante. Após incubação de 90 minutos a 37 °C, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T e a interação das proteínas com os componentes foi detectada por meio de incubação, por 1 hora a 37 °C, com antissoro policlonal contra a proteína recombinante correspondente em diluição na qual a absorbância a 492 nm fosse igual a 1,0 (rLIC11009 – 1:1000; rLIC11360 e rLIC11975 – 1:500). As placas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas por 1 hora, a 37 °C, com 100 µL/poço de anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma - Aldrich) diluído 1:5000 em PBS. A seguir as placas foram lavadas três vezes e a reação de ligação foi visualizada por meio de revelação com o substrato OPD, como descrito anteriormente.

Essa reação foi realizada em triplicata para cada componente, e para avaliar sua reatividade basal, um poço de cada um não foi incubado com a proteína recombinante (BARBOSA et al., 2006; CAMERON, 2003).

Para análise estatística a interação das proteínas recombinantes com os componentes da MEC e do plasma humano foi comparada com sua ligação ao BSA, fetuína e gelatina utilizando o teste *t* de Student bicaudal, e o valor *P* foi calculado em relação à comparação da sua interação com a fetuína.

As interações foram confirmadas pela realização de um ensaio semelhante no qual foi utilizado, para detecção da ligação, um anticorpo monoclonal

antipolihistidina conjugado à peroxidase (Sigma – Aldrich) e previamente titulado contra cada proteína recombinante (1:10000).

2.19 Curvas de dose-resposta

Para avaliar se a interação das proteínas com os componentes da MEC e do plasma é dose dependente, placas de microdiluição foram revestidas com 1 µg de cada componente por 3 horas a 37 °C. As placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com tampão PBS-T/Leite por 1 hora a 37 °C, seguida de incubação a 4 °C por 16 horas. Em seguida, os componentes foram incubados, por 90 minutos, a 37 °C, com concentrações crescentes das proteínas recombinantes diluídas em tampão PBS (100 µL/poço). A detecção das proteínas ligadas foi realizada por incubação, por 1 hora a 37 °C, com o antissoro contra cada proteína em diluição apropriada, seguida de incubação por 1 hora, a 37 °C, com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase e diluído 1:5000 em PBS. A reação foi revelada com o substrato OPD como descrito anteriormente.

Os dados do teste de ELISA foram utilizados para calcular a constante de dissociação (K_D) de acordo com o método descrito por Lin et al. (2009), tendo como base a equação:

$$K_D = (A_{max} \cdot [proteína] / A) - [proteína]$$

em que A é a absorbância a uma determinada concentração de proteína, A_{max} é a absorbância máxima para o leitor de placas de ELISA (equilíbrio), [proteína] é a concentração de proteína e K_D é a constante de dissociação do equilíbrio para uma dada absorbância em uma dada concentração de proteína.

2.20 Ensaio de interação das proteínas recombinantes desnaturadas com componentes da MEC e do plasma humano

A avaliação da interação das proteínas recombinantes desnaturadas com componentes da MEC e do plasma humano foi realizada por ELISA, exatamente como descrito na seção 2.18, porém antes de elas serem adicionadas à placa, elas foram aquecidas por 10 minutos a 96 °C. BSA foi utilizado como controle negativo.

Para análise estatística a interação das proteínas recombinantes aquecidas foi comparada com a interação das proteínas recombinantes que não foram

previamente aquecidas utilizando o teste *t* bicaudal, e redução significativa na interação foi considerada quando valor de $P < 0,05$.

2.21 Bloqueio da interação proteína-MEC/plasma humano por antissoro contra proteína recombinante

Um micrograma de cada componente foi imobilizado em placa de 96 poços por 16 horas a 4 °C. Os poços foram lavados três vezes com PBS-T e bloqueados com 200 µL de PBS-T/Leite por 2 horas a 37 °C. Antes das proteínas recombinantes serem adicionadas às placas, elas foram incubadas por 1 hora, a 37 °C, com os respectivos anticorpos em diluição 10 vezes menor em relação à diluição utilizada para detecção da ligação (seção 2.18; rLIC11009 – 1:100, rLIC11360 e rLI11975 – 1:50). Em seguida, 1 µg/poço de cada proteína recombinante foi incubado por 90 minutos, a 37 °C, com os componentes. Após seis lavagens com PBS-T, as proteínas recombinantes que interagiram com algum componente foram detectadas pela adição de anticorpo monoclonal antipoli-histidina conjugado a peroxidase (Sigma – Aldrich) diluído 1:10000 em 100 µL de PBS. A reação foi revelada com OPD como descrito anteriormente.

Para análise estatística, a interação das proteínas recombinantes que foram previamente bloqueadas foi comparada com a interação das proteínas recombinantes não tratadas utilizando o teste *t* bicaudal.

2.22 Tratamento de glicoproteínas com metaperiodato de sódio

Laminina, fibronectina plasmática, fator H, C4BP e fibrinogênio (250 ng) foram imobilizados em placas de microdiluição de 96 poços em 50 µL de tampão 50 mM acetato de sódio (pH 5,0). Após 16 horas, cada componente foi tratado com concentrações crescentes de metaperiodato de sódio (0-100 mM, Sigma - Aldrich) por 1 hora, a temperatura ambiente, no escuro. A interação das proteínas recombinantes foi avaliada por ELISA conforme descrito acima.

2.23 Competição entre heparina e proteína recombinante na interação com fragmentos proteolíticos da fibronectina plasmática

Um micrograma de cada fragmento proteolítico (F70 e F30) adsorvido em placa de microdiluição foi incubado, concomitantemente, com 1 μ M de proteína recombinante e concentrações crescentes de heparina sódica (0-350 IU, Sigma – Aldrich). A detecção das proteínas que interagiram com os fragmentos foi realizada por ELISA seguindo o mesmo procedimento descrito previamente.

2.24 Competição entre proteína recombinante e ácido aminocaproico (ACA) na interação com o PLG

A competição entre as proteínas recombinantes e o ACA (Sigma – Aldrich) na interação com o PLG foi avaliada pela técnica de ELISA como descrito por Vieira et al. (2009). Resumidamente, 1 μ g de proteína recombinante foi colocado para interagir com PLG na presença de 2 mM ou 20 mM de ACA. Em seguida, a interação PLG-proteína foi detectada pela adição de antissoro específico para cada proteína recombinante, como descrito acima.

Para a análise estatística a interação das proteínas recombinantes com o PLG na presença do ACA foi comparada com sua interação na ausência do ACA (0 mM) utilizando o teste *t* bicaudal.

2.25 Conversão do PLG em plasmina

A capacidade do PLG ligado às proteínas recombinantes ser convertido em plasmina foi avaliada de acordo com o protocolo descrito por Vieira et al. (2009). Basicamente, 1 μ g de proteína recombinante foi incubado com 1 μ g de PLG a fim de que ocorresse interação entre eles, como já descrito anteriormente. Em seguida, foram adicionados em cada poço 4 ng de ativador de plasminogênio uroquinase (uPA – Sigma - Aldrich) e 0,4 mM de *D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride* (Sigma – Aldrich), um substrato cromógeno específico para a plasmina. Após incubação de 16 horas a 37 °C, a conversão do substrato foi mensurada em espectrofotômetro realizando leituras no comprimento de onda de 405 nm.

Poços faltando algum dos componentes (PLG, uPA ou substrato) foram utilizados como controles negativos, enquanto que BSA foi utilizado como controle da reação de interação PLG-proteína recombinante.

2.26 Inibição da catálise do fibrinogênio em fibrina

Neste ensaio, 2 μ M de rLIC11975 foi incubado, por 2 horas a 37 °C, com 1 mg/mL de fibrinogênio diluído em PBS. Em seguida, placas de microdiluição foram revestidas com 90 μ L/poço dessa mistura acrescido de 10 μ L/poço de trombina (10 U/mL). A formação de fibrina foi monitorada, a cada 1 minuto por 10 minutos, e depois a cada 5 minutos por 35 minutos, por uma leitora de ELISA (Multiskan EX; Thermo Fisher Scientific, Helsinki, Finlândia) em comprimento de onda de 595 nm. Como controle positivo da reação foi utilizado 1 mg/mL de fibrinogênio junto com 10 U/mL de trombina, e como controle negativo a trombina foi omitida. Os valores de absorbância obtidos a 595 nm no tempo de 45 minutos foram utilizados para comparar a redução da formação de fibrina em relação ao controle positivo (100%) utilizando o teste *t* bicaudal.

2.27 Competição entre fator H e C4BP pela rLIC11360

Placas de microdiluição foram adsorvidas com 1 μ g/poço de proteína por 16 horas a 4 °C. Em seguida as placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com PBS-T/Leite por 2 horas a 37 °C. Dado esse tempo, a solução de bloqueio foi descartada e as placas foram incubadas, por 2 horas a 37 °C, com 1 μ g de fator H e concentrações crescentes de C4BP (0 a 1 μ g), ou o oposto, 1 μ g de C4BP e concentrações crescentes de fator H (0 a 1 μ g). Após seis lavagens com PBS-T, a interação dos componentes foi feita por incubação, por 1 hora a 37 °C, com anti-fator H ou anti-C4BP (1:5000), seguido de incubação com anticorpos secundários anticabra (1:20000) ou anticoelho (1:5000), respectivamente. A reação foi revelada com OPD como já descrito anteriormente.

Para os cálculos estatísticos, a interação de um componente na presença de concentrações variadas do outro foi comparada com sua interação na ausência desse outro componente (0 μ g) pelo teste *t* bicaudal.

2.28 Atividade de cofator do C4BP e do fator H

Dois microgramas de proteína recombinante foram imobilizados em placa de microdiluição por 16 horas a 4 °C. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e bloqueada, por 2 horas a 37 °C, com 200 µL/poço de PBS-T contendo 3% de BSA. Após esse período, a solução de bloqueio foi descartada e foram adicionados dois microgramas de fator H ou C4BP. A incubação foi realizada por 90 minutos a 37 °C. A placa foi lavada novamente com PBS-T e incubada, por 16 horas, a 37 °C, com 500 ng de fator I e 1 µg de C3b, quando a proteína foi incubada com fator H, ou C4b, quando a proteína foi incubada com C4BP. A proteína rLIC11975 foi utilizada como controle negativo para ligação do fator H e do C4BP. Reações omitindo o fator H e C4BP também foram usadas como controles negativos, enquanto que reações faltando a proteína recombinante foram utilizadas como controles positivos.

O sobrenadante de cada reação foi aplicado em SDS-PAGE 10% e transferido para uma membrana de nitrocelulose ou corado com prata utilizando o kit *Silver Staining kit, Protein* (GE Healthcare). Para o imunoblotting, os fragmentos resultantes da clivagem de C3b e C4b foram detectados utilizando anti-C3 humano produzido em cabra (1:5000) ou anti-C4d humano produzido em camundongo (1:1000), respectivamente. A visualização das bandas foi realizada após incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase anticabra (1:50000) ou anticamundongo (1:5000), utilizando o substrato SuperSignal West Dura (Thermo Pierce Scientific) e o aparelho GelLogic 2200 Pro (Carestream Health, Inc.).

2.29 Ensaio de inibição da interação das leptospiros vivas aos componentes da MEC e do plasma humano pelas proteínas recombinantes

Componentes da MEC e do plasma humano (1 µg) foram imobilizados em placas de microdiluição por 3 horas a 37 °C. Em seguida, as placas foram bloqueadas por 1 hora, a 37 °C, e 16 horas, a 4 °C. Após serem lavadas com PBS-T, as placas foram incubadas com concentrações crescentes de proteína recombinante (0-10 µg) por 90 minutos a 37 °C. As placas foram lavadas novamente e incubadas com 4×10^7 leptospira vivas (*L. interrogans* sorovar Copenhageni M-20) por 90 minutos a 37 °C. A detecção da interação das leptospiros com os

componentes foi feita indiretamente empregando anti-LipL32 (1:2000) produzido em camundongo, seguindo o princípio de que a LipL32 é a proteína majoritária da membrana externa da leptospira (HAAKE et al., 2000; MALMSTROM et al., 2009). A presença de anti-LipL32 foi detectada utilizando anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma – Aldrich) e substrato OPD, como descrito previamente.

2.30 Ensaio de imunoproteção

2.30.1 Cálculo da DL_{50} (dose letal)

Para calcular a DL_{50} leptospiras virulentas recém-isoladas foram contadas em câmara de Petroff-Hausser utilizando microscopia de campo escuro e em seguida diluídas em séries de 10 vezes (10^{-1} - 10^{-10} /mL). Cada grupo de hamster foi imunizado com uma diluição. Os animais foram observados por aproximadamente 21 dias, e ao final desse período os animais mortos foram contabilizados. A última diluição em que 50% dos animais tivessem sido mortos foi multiplicada por 100 para obtenção da diluição a ser usada no desafio dos animais imunizados (dose do desafio = $DL_{50} \times 100$).

2.30.2 Preparo da bactéria

A bactéria foi preparada de acordo com o protocolo descrito por Silva et al. (2007). Em resumo, leptospiras virulentas recém-isoladas de animal doente foram contadas em microscópio de campo escuro e doses contendo 10^9 leptospiras/animal foram ajustadas. As bactérias foram centrifugadas, lavadas com PBS acrescido de 5 mM $MgCl_2$, e inativadas por calor, por meio de incubação a 56 °C por 20 minutos. Alíquotas foram armazenadas a -20 °C até sua utilização.

2.30.3 Desafio

Foram realizados três ensaios independentes de imunoproteção. Nos dois primeiros ensaios hamsters machos *Golden Syrian* recém-desmamados foram divididos em grupos de 12 animais. Cada grupo foi imunizado, subcutaneamente, com 50 µg de rLIC11009 ou PBS, como controle negativo, em suspensão contendo

Alhydrogel (2% $\text{Al}(\text{OH})_3$, Brenntag Biosector) como adjuvante. Animais imunizados com bacterina foram utilizados como controle positivo. Foram aplicadas 2 doses com intervalos de 15 dias, e 15 dias após cada dose 6 animais de cada grupo foram sangrados via plexo retro-orbital. O título dos anticorpos presentes nos soros desses animais foi avaliado como descrito no item 2.16.1, utilizando anti-IgG de hamster (KPL). Quinze dias após a segunda imunização os animais foram infectados por inoculação intraperitoneal com $2,5 \times 10^3$ *L. interrogans* sorovar Kennewicki LPF virulentas recém-isoladas.

No terceiro experimento foram utilizados grupos de 10 hamsters. Cada grupo foi imunizado com 50 μg de rLIC11360 ou PBS ou bacterina. Foram aplicadas 2 doses com intervalos de 15 dias, e 15 dias após cada dose 5 animais de cada grupo foram sangrados via plexo retro-orbital. Quinze dias após a última imunização os animais foram infectados por inoculação intraperitoneal com 10^4 *L. interrogans* sorovar Kennewicki LPF virulentas que estavam congeladas a -80°C .

Em ambos os experimentos os animais foram observados por 21 dias e os sobreviventes foram sacrificados. Esses animais tiveram seu sangue coletado por punção cardíaca, e seus rins extraídos para cultivo em meio EMJH semissólido (28°C) e avaliação da presença de eventuais leptospiros.

Todos os ensaios de imunoproteção foram realizados no laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism (1999), utilizando o método Kaplan-Meier (KAPLAN; MEIER, 1958).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção por bioinformática dos genes a serem estudados

Proteínas de membrana externa de microrganismos são atraentes objetos de estudo, pois estão em contato direto tanto com o ambiente, contribuindo para a sobrevivência da bactéria no meio, como com o hospedeiro, atuando nos seus mecanismos de patogenicidade. As leptospiros utilizam amplamente essas proteínas de superfície durante a infecção, tanto que a expressão de algumas delas é regulada de maneira diferente quando são submetidas às condições *in vivo* e *in vitro* (ATZINGEN et al., 2008; CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004; MATSUNAGA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010).

Por conta disso, os genes foram selecionados para este estudo com base em sua localização celular predita por programas de bioinformática. Diversos programas de predição teórica, bem como a sequência genômica da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004a), foram utilizados para auxiliar nessa seleção. Essa abordagem tem se mostrado promissora para a busca de candidatos vacinais e fatores envolvidos na patogenia de diversos microrganismos como *N. meningitidis* (DELANY; RAPPUOLI; SEIB, 2013), *Streptococcus pneumoniae* (WIZEMANN et al., 2001) e *Brucella* spp. (HE, 2012). Para a *Leptospira* essa estratégia também tem se mostrado interessante, permitindo, até o momento, a identificação de diversas proteínas com possível papel em sua patogenia como as proteínas multifuncionais LigA e LigB (MATSUNAGA et al., 2003), as proteínas da família Len (STEVENSON et al., 2007) e outras diversas adesinas como Lsa21 e Lsa27 (ATZINGEN et al., 2008; LONGHI et al., 2009; VIEIRA et al., 2014).

Os genes LIC11009, LIC11360, LIC11975, LIC13011 e LIC13477 foram identificados em cópias únicas na sequência gênica do cromossomo I da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004a). As cinco proteínas codificadas pelos genes em estudo também foram identificadas por proteômica na *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130, sendo que a proteína LIC11009 pode, ainda, ter seu número de cópias estimado em 2566 cópias/célula (MALMSTROM et al., 2009).

Um resumo das análises de bioinformática realizadas para os cinco genes selecionados para o estudo pode ser visualizado logo abaixo na Tabela 1.

Tabela 1 – Resumo das características preditas por análise de bioinformática para os genes em estudo

Gene ID	Anotação no Genoma ¹	Sítio de clivagem	Domínio conservado	Conservação ²
LIC11009	Proteína Hipotética	29-30 Spl	-	Lai (100%) LBH (80%) LlicsVM (62%)
LIC11360	Provável Lipoproteína	33-34 Spl	-	Lai (99%) LSS (67%) LBH (69%) LlicsVM (44%)
LIC11975	Proteína de Membrana Externa	33-34 TMH	-	Lai (99%) LlicsVM (54%) LBP (38%)
LIC13011	Provável Lipoproteína	21-22 SplI	-	Lai (99%)
LIC13477	Proteína Hipotética	26-27 Spl	DUF3549	Lai (99%) LBH (86%) LlicsVM (67%) LBP (47%)

Notas: Gene ID - identificação do gene no genoma. ¹<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic>.

²<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

Abreviaturas: LIC – *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Lai - *L. interrogans* sorovar Lai. LBH - *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis. LBP - *L. biflexa* sorovar Patoc. LlicsVM - *L. licerasiae* sorovar Varillal. LSS - *L. santarosai* sorovar Shermani. Spl – sítio de clivagem para a enzima peptidase sinal I. SplI – sítio de clivagem para a enzima peptidase sinal II. TMH – hélice transmembrana N-terminal. DUF – domínio de função desconhecida.

De acordo com o programa PSORT (NAKAI; KANEHISA, 1991; NAKAI; HORTON, 1999) as proteínas codificadas por esses genes são de membrana externa; o programa CELLO (YU; LIN; HWANG, 2004; YU et al., 2006) também prediz que as proteínas codificadas pelo genes LIC11009, LIC11975 e LIC13477 são de membrana externa.

Todas as proteínas de membrana externa de espiroquetas conhecidas até hoje são sintetizadas com um peptídeo sinal em sua região N-terminal, o qual promove a exportação da proteína para seu local de atuação biológica; assim que a proteína é translocada esse peptídeo é clivado em uma região específica (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004). Sítios de clivagem foram encontrados em todas as proteínas pelo servidor SignalP (BENDTSEN et al., 2004; NIELSEN et al., 1997). Segundo o servidor LipoP (JUNCKER et al., 2003), as proteínas LIC11009, LIC11360 e LIC13477 possuem sítio de clivagem para a enzima peptidase sinal I; a proteína LIC13011 possui sítio de clivagem para a enzima peptidase sinal II; e a

proteína LIC11975 uma região transmembrana, resultado que corrobora com a anotação do genoma (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>).

Nenhum domínio estrutural foi encontrado pelos programas PFAM (FINN et al., 2006; SONNHAMMER; EDDY; DURBIN, 1997) e SMART (LETUNIC et al., 2006; SCHULTZ et al., 1998) para as proteínas codificadas pelos genes LIC11009, LIC11360, LIC11975 e LIC13011. Na proteína codificada pelo gene LIC13477 o programa PFAM (FINN et al., 2006; SONNHAMMER; EDDY; DURBIN, 1997) conseguiu encontrar um domínio putativo com função desconhecida entre os aminoácidos 79 e 123 (DUF3549).

A ferramenta de BLAST (ALTSCHUL et al., 1990, 1997) emprega um banco de genomas de organismos já sequenciados (MARCHLER-BAUER et al., 2009), o qual permite avaliar a similaridade dos genes de interesse com outras espécies. Atualmente cinco espécies de *Leptospira* já tiveram seu genoma completamente sequenciado (BULACH et al., 2006; CHOU et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2004a,b; PICARDEAU et al., 2008b; REN et al., 2003; RICALDI et al., 2012; ZHONG et al., 2011) e diversas outras sequências parciais já foram e vêm sendo depositadas todos os dias em banco de dados. A análise comparativa das sequências de aminoácidos preditas mostrou que as cinco proteínas são altamente conservadas em diversas cepas de *Leptospira*, como pode ser observado claramente nos filogramas gerados pelo programa CLUSTALW2 (LARKIN et al., 2007), com destaque para a proteína LIC11360. Todas as sequências possuem alta similaridade com sequências presentes na *L. interrogans* sorovar Lai. Apenas as proteínas codificadas pelos genes LIC11975 e LIC13477 apresentam sequências similares na espécie saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc, porém essas similaridades são pequenas (38% e 47% respectivamente), como apresentado pela distância maior na organização dos ramos no filograma (Figura 4C e E).

Figura 4 – Filograma das seqüências de aminoácidos codificadas pelos genes LIC11009, LIC11360, LIC11975, LIC13011 e LIC13477

A

B

C

D

E

A similaridade das sequências de aminoácidos em estudo com a de outras espécies de *Leptospira* foi realizada pela ferramenta BLAST, e a filogenia foi realizada pelo programa ClustalW2. Os filogramas mostram a proximidade dos genes LIC11009 (A), LIC11360 (B), LIC11975 (C), LIC13011 (D) e LIC13477 (E) com as cepas patogênicas de *Leptospira*. Os braços mais distantes mostram as cepas intermediárias e saprofíticas.

3.2 Clonagem dos genes selecionados para estudo

Os genes LIC11009, LIC11360, LIC11975, LIC13011 e LIC13477 foram amplificados, sem o peptídeo sinal, por meio da técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos sintéticos desenhados a partir do DNA genômico da *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Os *amplicons* obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™ (Biotium) e apresentaram os tamanhos esperados de 648, 602, 978, 916 e 1497 pb para os fragmentos correspondentes aos genes LIC11009, LIC11360, LIC11975, LIC13011 e LIC13477, respectivamente (Figura 5).

Figura 5 – Fragmentos de DNA obtidos por PCR

Os *amplicons* correspondentes aos genes selecionados foram amplificados, sem o peptídeo sinal, a partir do DNA da *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M-20 utilizando a técnica da PCR. A visualização dos produtos da reação foi realizada em gel de agarose 1% corado com GelRed™. **(1)** LIC11009, 648 pb. **(2)** LIC11360, 602 pb. **(3)** LIC11975, 978 pb. **(4)** LIC13011, 916 pb. **(5)** LIC13477, 1497 pb. **(M)** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Após serem purificados, os *amplicons* obtidos foram subclonados no vetor pGEM-T Easy (Promega). Esse vetor foi utilizado para otimizar as reações da etapa de clonagem, pois ele é um vetor comercial linearizado que possui timidinas nas extremidades 3', as quais evitam sua recircularização e facilitam a ligação dos produtos da PCR realizada com a *Taq* polimerase, enzima que inicia a amplificação de uma sequência de nucleotídeos adicionando uma adenosina em cada extremidade 3' do *amplicon*. A introdução do inserto no sítio de múltipla clonagem desse vetor interrompe a região codificadora do peptídeo- α da enzima β -galactosidase e as colônias de *E. coli* transformadas com o plasmídeo recombinante se mantêm brancas quando plaqueadas em meio LB/Amp contendo X-Gal e IPTG.

Quando o inserto de DNA não é introduzido no vetor, a *E. coli* consegue expressar a enzima β -galactosidase que degrada o X-Gal tornando a colônia azul.

O DNA plasmidial (pGEM-T Easy/inserto) das colônias brancas selecionadas foi extraído e digerido com enzimas de restrição *XhoI/HindIII* (para os genes LIC11009, LIC11975 e LIC13477) ou *BamHI/HindIII* (para os genes LIC11360 e LIC13011) para confirmação da presença do inserto, bem como sua remoção (dados não mostrados).

Os insertos removidos do pGEM-T Easy foram transferidos para o vetor de expressão pAE (RAMOS et al., 2004) por restrição enzimática. Esse vetor foi escolhido para expressar as proteínas por oferecer a vantagem de possuir um tamanho pequeno (2,8 Kb), ser de alto número de cópias, e principalmente por permitir a expressão de proteínas recombinantes com 6 resíduos de histidina (6xHis) na extremidade N-terminal, o que possibilita a purificação das mesmas por cromatografia de afinidade ao metal, visto que as histidinas se ligam fortemente ao níquel. Sendo assim, dois clones recombinantes foram selecionados para cada gene por extração rápida do DNA plasmidial (pAE/inserto) com fenol-clorofórmio.

O sucesso da clonagem foi confirmado pela liberação do inserto após digestão plasmidial com as enzimas de restrição apropriadas (Figura 6) e por sequenciamento automático utilizando o método de terminação em cadeia. Esse método utiliza 2',3' ddNTPs, que são moléculas sintéticas semelhantes aos dNTPs porém sem uma hidroxila no carbono 3' da ribose. Essa modificação impede que um novo nucleotídeo seja incorporado à nova sequência nucleotídica que está sendo formada, interrompendo de maneira aleatória a síntese do DNA. Essas moléculas são marcadas por substâncias fluorescentes que, quando excitadas por um laser, emitem um espectro específico permitindo sua detecção por um computador, esse por sua vez gera um cromatograma com as sequências de nucleotídeos (GLICK et al., 2010; SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Na análise dos cromatogramas gerados foi possível constatar a integridade de todas as sequências de nucleotídeos clonadas, assim como sua introdução na fase correta de leitura no vetor pAE (Apêndice A).

Figura 6 – Liberação de inserto do vetor de expressão pAE após digestão com enzimas de restrição

O DNA plasmidial pAE/LIC foi digerido com enzimas de restrição apropriadas. A visualização do inserto liberado foi realizada em gel de agarose 1% corado com GelRed™ somente após o plasmídeo ser digerido com as duas enzimas. Massas moleculares em kb estão apontadas à esquerda das figuras (M).

3.3 Avaliação da expressão das proteínas recombinantes

Graças a sua habilidade em crescer fácil e rapidamente, e ao grande conhecimento que se tem de sua genética, a *E. coli* é considerada um dos mais eficientes sistemas para expressão heteróloga de proteínas (BANEYX, 1999). Para o estudo de indução foram empregadas quatro cepas de *E. coli*: BL21-SI, BL21(DE3), BL21 Star™(DE3)pLysS (Invitrogen) e C43(DE3) (Avidis).

A cepa BL21-SI foi utilizada por possuir o gene da T7 RNA polimerase sob controle do promotor *proU* que é induzível por NaCl (BHANDARI; GOWRISHANKAR, 1997). Considerando que nas linhagens (DE3) esse gene está sob controle do promotor *lac UV5*, que é induzível por IPTG, a utilização da cepa BL21-SI torna o processo de obtenção da proteína mais econômico. No entanto, as cepas C43(DE3) e BL21 Star™(DE3)pLysS permitem uma expressão mais eficiente de proteínas que possam ser tóxicas para outras cepas de *E. coli*. A cepa C43(DE3),

um duplo mutante da cepa C41(DE3), contém mutações genéticas que a torna fenotipicamente estável e, portanto, tolerante a toxicidade (MIROUX; WALKER, 1996). Já a *E. coli* BL21 StarTM(DE3)pLysS é eficiente para expressão de proteínas tóxicas pelo fato de possuir o plasmídeo pLysS que induz a expressão da enzima T7 lisozima, um inibidor natural da T7 RNA polimerase, reduzindo a expressão basal de proteínas na ausência de indutores (STUDIER, 1991).

As bactérias competentes foram transformadas e cultivadas até a fase log para indução da expressão dos plasmídeos recombinantes com diferentes concentrações de indutores. As culturas foram centrifugadas e lisadas por sonicação em banho de gelo. As frações (sobrenadante e sedimento) resultantes foram analisadas em SDS-PAGE 15% (Figura 7). Aparentemente todas as proteínas recombinantes foram expressas com sucesso, quando comparadas com o controle “não induzido”. Essa comparação foi realizada de acordo com a massa molecular calculada pelo programa ProtParam (GASTEIGER, 2006) tendo como base a composição dos aminoácidos (Quadro 6).

Quadro 6 – Resumo da análise *in silico* das proteínas recombinantes

Proteína	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico
rLIC11009	25,6	5,78
rLIC11360	22,5	6,18
rLIC11975	36,0	6,04
rLIC13011	27,5	8,32
rLIC13477	57,5	6,91

Abreviatura: LIC – *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni.

A cinética de indução foi realizada na tentativa de obter a expressão das proteínas recombinantes na forma solúvel, entretanto ao compararmos as frações solúveis e insolúveis obtidas (Figura 7) podemos observar que todas as proteínas foram expressas na fase insolúvel em formato de corpúsculos de inclusão. As proteínas rLIC11009 e rLIC11975 foram expressas em todas as cepas testadas, portanto a cepa BL21-SI foi a escolhida para expressá-las, levando em conta o custo-benefício. O mesmo raciocínio foi levado em consideração para expressão da rLIC11360, visto que essa proteína mostrou expressão significativa nas cepas BL21-SI, BL21(DE3) e BL21 StarTM(DE3)pLysS.

As proteínas recombinantes LIC13011 e LIC13477 também mostraram expressão significativa na cepa BL21-SI, porém essas expressões se apresentaram muito instáveis. Por essa razão, a cepa C43(DE3) foi escolhida para expressão da rLIC13477 e a BL21(DE3) para expressão da rLIC13011.

Figura 7 – Análise da expressão das proteínas recombinantes em cepas de *E. coli*

A indução da expressão gênica foi realizada em diferentes cepas de *E. coli* com diferentes concentrações (mM) de NaCl (BL21-SI) ou IPTG (linhagem DE3). A análise da expressão das proteínas recombinantes foi feita por comparação com o controle “não induzido”, tendo como base a massa molecular predita. A visualização foi feita em SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie. **(M)** Marcador molecular (kDa). **(E)** *E. coli* selvagem. **(NI)** *E. coli* cultivada sem e **(I)** com indutor. Após lise das células bacterianas: **(S)** fração solúvel e **(In)** insolúvel. Setas vermelhas indicam a concentração e cepa escolhidas para expressão da proteína recombinante em maior escala.

Já que o vetor de expressão pAE permite a clonagem de proteínas em fusão com resíduos de histidina, foi realizado um imunoblotting utilizando anticorpo antipoli-histidina para confirmar a expressão das proteínas recombinantes. Para isso, foram aplicados em SDS-PAGE 20 µL da bactéria selvagem, 20 µL da cultura não induzida e 20 µL das frações com expressão aparente, de linhagem correspondente à escolhida de acordo com os critérios comentados acima (Figura 7 – seta vermelha). Em seguida, as frações foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Na Figura 8, a reação de quimioluminescência revela bandas com tamanhos correspondentes aos das proteínas recombinantes somente no extrato total de bactéria induzida e na fração insolúvel, mostrando que essas proteínas foram realmente expressas nas cepas e condições já mencionadas.

Figura 8 – Análise e confirmação da expressão das proteínas recombinantes

A. rLIC11009. B. rLIC11360. C. rLIC11975. D. rLIC13011. E. rLIC13477. A expressão das proteínas recombinantes foi confirmada por imunoblotting utilizando anticorpo monoclonal antipoli-histidina (1:1000). A revelação foi realizada com kit ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) em filmes de raio-X. **(1)** *E. coli* selvagem. **(2)** Cultura bacteriana na ausência de indutor. **(3)** Cultura bacteriana na presença de indutor. **(4)** Fração solúvel. **(5)** Fração insolúvel.

3.4 Purificação das proteínas recombinantes expressas

Todas as proteínas recombinantes foram expressas na forma insolúvel, como corpúsculos de inclusão, por isso antes de purificá-las foi necessário solubilizá-las com algum agente desnaturante, como ureia e guanidina (SORENSEN et al., 2004). Neste trabalho, a ureia foi utilizada para a solubilização de todas as proteínas.

Após serem solubilizadas, as proteínas foram submetidas à purificação por cromatografia de afinidade ao metal. O uso dessa metodologia foi possível graças ao fato de que o sistema de expressão utilizado adiciona seis resíduos de histidina na

extremidade N-terminal da proteína recombinante. Os resíduos de histidina se ligam fortemente ao níquel via anel imidazólico permitindo que os contaminantes sejam removidos por sucessivas lavagens com tampões contendo baixas concentrações de imidazol e em seguida a proteína recombinante seja eluída, por competição, em tampão com alta concentração de imidazol.

Para a purificação da rLIC11009 e da rLIC11360 foram utilizados 200 mL de cultura de *E. coli* BL21-SI e para a purificação da rLIC11975 400 mL de cultura dessa mesma cepa. Já para a purificação da rLIC13011 foram utilizados 50 mL de *E. coli* BL21(DE3) e para a purificação da rLIC13477, 200 mL de C43(DE3). As proteínas rLIC11009, rLIC11975, rLIC13011 e rLIC13477 foram renaturadas pelo método de remoção gradativa da ureia na coluna de *Sepharose*, antes de serem purificadas. O sistema de diluição por gotejamento em tampão de renaturação com pH 12,0 foi utilizado na renaturação da rLIC11360. Essas condições foram estabelecidas empiricamente, de modo que fosse possível obter proteínas relativamente estáveis que pudessem ser submetidas ao processo de purificação.

A etapa de purificação foi bem sucedida para todas as proteínas recombinantes. Após esse processo, as proteínas foram dialisadas contra tampões sem imidazol com o intuito de removê-lo. Entretanto, essa etapa não foi bem sucedida para a rLIC13477 que precipitou ao ter o imidazol removido e por isso teve que ser armazenada no próprio tampão de eluição.

As proteínas recombinantes purificadas tiveram suas concentrações estimadas por meio de comparação com massas conhecidas de BSA (Figura 9). A maior concentração obtida foi para a rLIC11009, em torno de 0,35 µg/µL. Para as proteínas rLIC11360 e rLIC11975 a concentração foi em torno de 0,2 µg/µL, enquanto que para rLIC13011 e rLIC13477 a concentração foi de 0,1 µg/µL.

Apesar das proteínas rLIC13477 e rLIC13011 terem sido purificadas com eficiência, ambas se mostraram altamente instáveis após esse processo, evento que nos levou a interromper nossos estudos com as mesmas.

Figura 9 – Estimativa da concentração das proteínas recombinantes purificadas

As proteínas recombinantes purificadas foram separadas por SDS-PAGE e coradas com azul de Coomassie. Suas concentrações foram estimadas por comparação com massas conhecidas de BSA. **(M)** Marcador molecular (kDa). **(1)** 20 µL rLIC11975. **(2)** 20 µL rLIC13477. **(3)** 20 µL rLIC11360. **(4)** 20 µL rLIC13011. **(5)** 20 µL rLIC11009. **(6-10)** Concentrações 4, 3, 2, 1, 0,5 µg de BSA.

3.5 Análise da estrutura secundária das proteínas recombinantes purificadas

Ao se obter proteínas recombinantes é necessário avaliar se as mesmas se encontram estruturadas, principalmente quando elas são expressas na forma de corpúsculos de inclusão e precisam passar pelos processos de desnaturação e renaturação, como é o caso das proteínas em estudo. O CD é uma técnica reconhecida que permite o estudo dos elementos de estrutura secundária das proteínas em solução (α -hélice, estrutura β e estrutura randômica), elementos os quais contribuem na formação da sua estrutura terciária (KELLY; JESS; PRICE, 2005). Essa técnica está baseada no fato de que moléculas com centros assimétricos (sua imagem espelho não é idêntica) absorvem a luz circularmente polarizada para a direita de maneira diferente da luz circularmente polarizada para a esquerda provocando um desvio no ângulo da polarização da luz incidente para a direita ou esquerda (elipticidade), que é medido pelo polarímetro. Essas moléculas são chamadas de quirais (RANJBAR; GILL, 2009).

Os cromóforos que originam os espectros de CD em peptídeos e proteínas são os elementos estruturais que resultam na estrutura secundária (KELLY; JESS; PRICE, 2005). Cada elemento possui um espectro característico. As ligações peptídicas absorvem luz em faixa abaixo de 240 nm, cadeias aromáticas entre 260 e 320 nm, e pontes dissulfeto em torno de 260 nm. Dessa forma, proteínas com estrutura α -hélice possuem faixas negativas a 208 e 222 nm e uma faixa positiva a

193 nm, enquanto que proteínas com estruturas folha- β antiparalelas apresentam faixa negativa a 218 nm e faixa positiva a 196 nm, e proteínas com estruturas randômicas (não ordenadas) apresentam sinais de elipticidade muito baixos com faixas positiva e negativa de 212 e 198 nm, respectivamente (Figura 10) (RANJBAR; GILL, 2009).

Figura 10 – Espectroscopia circular associada aos vários tipos de estruturas secundárias

Notas: Linha sólida - alfa-hélice. Tracejado longo - folha beta antiparalela. Tracejado curto - estrutura irregular.

Fonte: Modificado de KELLY et al. (2005)

O NaCl presente no tampão de eluição das proteínas recombinantes provoca ruídos na leitura dos espectros, por isso as proteínas rLIC11009 e rLIC11975 purificadas foram dialisadas, a 4 °C, contra solução tampão contendo 20 mM fosfato de sódio (pH 7,4), enquanto que a proteína rLIC11360 foi dialisada, a 4 °C, contra tampão contendo 10 mM Tris (pH 12,0). Os espectros obtidos e as médias resultantes para as três proteínas podem ser visualizados na Figura 11. As três proteínas recombinantes apresentam estrutura secundária e os resultados das análises dos espectros pelo programa K2D3 podem ser visualizados na Tabela 2. Esses resultados asseguram o uso dessas proteínas em ensaios posteriores de caracterização da função.

Figura 11 – Espectros de dicroísmo circular das proteínas recombinantes purificadas

(A) Proteína rLIC11009. (B) Proteína rLIC11360. (C) Proteína rLIC11975. Os espectros foram medidos a 20 °C em um espectropolarímetro e estão apresentados como uma média de cinco escaneamentos em intervalos de 185 a 260 nm.

Tabela 2 – Análise dos espectros de CD pelo programa K2D3

Proteína	folha- β (%)	α -hélice (%)
rLIC11009	43,15	3,27
rLIC11360	35,95	9,50
rLIC11975	8,34	55,67

3.6 Avaliação da atividade imunogênica das proteínas recombinantes em camundongos

Camundongos foram imunizados, em esquema de 3 doses, com 10 μ g de proteína recombinante em suspensão com *Alhydrogel* (Brenntag Bisosector). O principal objetivo dessa imunização foi a obtenção de soros hiperimunes para aplicação em ensaios de ELISA e imunoblotting durante a caracterização da função e localização celular de cada proteína. Porém, compreender como antígenos proteicos estimulam o sistema imune pode proporcionar uma nova visão a cerca dos mecanismos de imunidade contra a leptospira, que ainda são pouco conhecidos.

A presença de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes nos soros de camundongos foi avaliada 15 dias após cada dose aplicada, o que permitiu observar um aumento nos títulos após sucessivos reforços, sendo a mais imunogênica a rLIC11009 (Figura 12). Esse evento mostra que todas as proteínas recombinantes provavelmente estimulam uma resposta imune do tipo Th2. Os soros dos camundongos do grupo controle, imunizados somente com PBS, não apresentaram nenhum título (dados não mostrados). A média dos títulos dos soros dos camundongos obtidas 15 dias após a terceira imunização pode ser visualizada na Figura 12B.

Figura 12 – Títulos de IgG dos soros de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes

B

Proteína Recombinante	Título
rLIC11009	51.200
rLIC11360	6.400
rLIC11975	6.400

Camundongos BALB/c foram imunizados subcutaneamente com três doses, em intervalos de 15 dias, de proteína recombinante purificada (10 µg) adsorvida em hidróxido de alumínio. Quinze dias após cada imunização os camundongos foram sangrados e o título dos soros foi determinado por diluição seriada utilizando a técnica de ELISA.

O reconhecimento das proteínas recombinantes pelos antissoros também foi avaliado por imunoblotting. A visualização de uma banda com massa molecular

correspondente a cada proteína confirma a reatividade dos antissoros policlonais (Figura 13).

Figura 13 – Reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos gerados a partir da imunização de camundongos

(1) rLIC11009. (2) rLIC11360. (3) rLIC11975. Cinco microgramas de proteína recombinante foram aplicados em gel de SDS e transferidos para membrana de nitrocelulose. As proteínas recombinantes foram incubadas com antissoro específico diluído 1:5000. A reação foi revelada por quimioluminescência utilizando o kit ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) e filmes de raio-X.

Devido ao fato de ser altamente sorovar específica, há cerca de vinte anos atrás, pensava-se que a imunidade protetora contra leptospira seria exclusivamente humoral (FAINE et al., 1999). Pouco tempo depois, tomou-se conhecimento de que a proteção em relação à leptospirose não seria dirigida exclusivamente por esse ramo da imunidade. Naiman et al. (2001) demonstraram a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e $\gamma\delta$ de bovinos imunizados com vacinas produzidas a partir de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo. Um estudo um pouco mais recente também demonstrou que as leptospirose patogênicas induzem em hamsters resposta imune do tipo Th1 combinada com a produção de anti-LPS (VERNEL-PAUILLAC; MERIEN, 2006).

Nesse sentido, resolvemos detalhar o perfil imunogênico produzido pelas proteínas recombinantes em camundongos. Para isso, quinze dias após a última imunização os camundongos foram sacrificados e tiveram seus baços extraídos para cultivo dos esplenócitos. Esses esplenócitos foram estimulados por 48 horas com ConA, ou proteína recombinante, ou leptospirose vivas. ConA é uma lecitina que possui alta capacidade mitogênica e potente efeito estimulante em linfoblastos (DUTTON, 1972; DWYER; JOHNSON, 1981) e por isso foi utilizada como controle positivo. Esplenócitos incubados somente com meio RPMI foram utilizados como

controle negativo, assim como esplenócitos extraídos de animais não imunizados (PBS).

A proliferação das células foi determinada pela avaliação da quantidade de BrdU incorporada ao DNA. BrdU é um nucleosídeo sintético, análogo da timidina, que pode ser incorporado a uma nova sequência de DNA durante a sua replicação. A quantidade de BrdU incorporada pode ser detectada por anticorpo específico utilizando a técnica de ELISA (GRATZNER, 1982).

Como é possível observar na Figura 14, as células de todos os grupos se mostraram viáveis, o que é evidenciado pela alta proliferação dos esplenócitos estimulados com o mitógeno ConA. Proliferação celular significativa foi observada somente quando os esplenócitos dos camundongos imunizados com a proteína rLIC11975 foram estimulados *in vitro* com a mesma proteína, indicando uma possível ativação da resposta imune mediada por células. Quando os esplenócitos dos camundongos imunizados com a proteína rLIC11360 foram estimulados com a mesma proteína foi possível observar proliferação das células, porém a mesma proliferação foi observada nos esplenócitos dos animais não imunizados, indicando que a linfoproliferação não é decorrente de um estímulo primário. O mesmo perfil de proliferação foi observado quando os esplenócitos dos camundongos imunizados com as proteínas rLIC11009, rLIC11360 e rLIC11975 foram estimulados com as leptospiros vivas.

Figura 14 – Estímulo da proliferação *in vitro* de esplenócitos extraídos de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes

Esplenócitos extraídos de camundongos imunizados com rLIC11009 (**A**), rLIC11360 (**B**), rLIC11975 (**C**), ou de animais não imunizados (PBS) foram cultivados e estimulados por 48 horas com ConA (controle positivo, 5 µg/mL), proteína recombinante (5 µg/mL) ou *L. interrogans* sorovar Copenhageni M-20 (2×10^8). A proliferação das células foi determinada em função da síntese de DNA pelo ensaio colorimétrico ELISA-BrdU. As barras representam as médias das absorbâncias $\pm$ quatro desvios padrões para cada proteína e são representativas de dois experimentos independentes. Para a análise estatística, os valores de DO dos esplenócitos cultivados com estímulo foram comparados, pelo teste *t* bicaudal, com os valores dos esplenócitos cultivados sem estímulo (RPMI), dentro do mesmo grupo de animais. Proliferação dos esplenócitos primados e estimulados com a proteína ou leptospiros só foi considerada significativa quando não houve estímulo para as células do grupo PBS (* $P < 0,005$).

Após 48 horas de cultivo, os esplenócitos foram centrifugados e os sobrenadantes foram avaliados quanto aos níveis de citocinas, por ELISA. Níveis de IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α foram mensurados na tentativa de discriminar a indução de uma resposta imune celular (Th1) ou humoral (Th2) pelas proteínas recombinantes.

Citocinas são proteínas produzidas por diversas células do sistema imune em resposta a algum antígeno e estão envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desenrolar da resposta imune. IL-4 e IL-10 foram utilizadas como marcadores de resposta imune Th2, enquanto que IFN- γ , TNF- α e IL-12 foram utilizadas como marcadores de resposta Th1. IL-4 é produzida principalmente por mastócitos e células T CD4+ após ativação da resposta imune adaptativa e é o principal estímulo para o desenvolvimento de células Th2. IL-10 é geralmente

produzida por macrófagos e linfócitos Th2, atuando como inibidor de macrófagos, entretanto também foi descrita como uma citocina moduladora, restringindo e impedindo uma resposta imune excessiva e danos colaterais (SABAT et al., 2010). IFN- γ é produzida por células Th1 CD4+, células T CD8+ e células NK (*natural killer*) e, portanto atua tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa ativando macrófagos e estimulando a proliferação de células Th1. IFN- γ ainda aumenta a síntese de TNF- α por macrófagos estimulados por LPS, que por sua vez age nas células do endotélio vascular e leucócitos estimulando o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção. IL-12 é produzida por células apresentadoras de antígenos principalmente em resposta às infecções por bactérias intracelulares e vírus; também estimula a diferenciação de células T CD4+ em células Th1 e a produção de IFN- γ (AMSEN; SPILIANAKIS; FLAVELL, 2009).

O perfil de citocinas obtido (Figura 15) demonstrou a predominância de secreção de IL-10 pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e estimulados com as proteínas rLIC11009, rLIC11360 e rLIC11975. IL-10 também foi produzida pelos esplenócitos dos camundongos imunizados com a proteína rLIC11360 que foram estimulados *in vitro* com leptospirosas vivas. Já foi observado, que no caso da leptospirose, a indução de IL-10 é maior em camundongos do que em hamsters (MATSUI et al., 2011).

Em relação aos esplenócitos dos animais imunizados com a rLIC11975, níveis significativos de IL-4, TNF- α e IFN- γ também foram detectados. Essa última citocina também foi secretada significativamente por esplenócitos de camundongos primados e estimulados com rLIC11360. Níveis estatisticamente significativos de TNF- α foram detectados quando as células dos animais imunizados com rLIC11009 foram estimuladas com a mesma proteína. Em contraste, níveis significativos de IL-12 não foram detectados em nenhuma das amostras, resultado já esperado se considerarmos que a produção dessa citocina é estimulada por microrganismos intracelulares.

Sendo assim, os elevados níveis de anticorpos nos soros dos animais imunizados com a rLIC11009, associados aos altos níveis de IL-10 secretada pelos esplenócitos dos mesmos animais, permite inferir que essa proteína recombinante é capaz de induzir somente uma resposta imune humoral. Os níveis de TNF- α secretados por essas células foram menos expressivos e podem ser em decorrência de estímulo pelo LPS, o mais potente desencadeador de produção dessa citocina

por macrófagos (MOOTOO et al., 2009); tanto que níveis semelhantes foram secretados por células primadas e não primadas quando estimuladas com a bactéria viva. Já para a rLIC11360, a resposta celular parece sobrepor a humoral, pois foram observadas baixa produção de anticorpos e elevada secreção de IL-10 e IFN- γ . Apesar da presença de IL-10 ser marcante em resposta Th2, a sua atividade moduladora direciona a resposta imune para Th1 quando em presença de IFN- γ (SABAT et al., 2010).

A proteína rLIC11975 aparenta ser capaz de induzir tanto resposta imune humoral quanto celular, pois foi observado estímulo de produção de anticorpos e de linfoproliferação celular, além de secreção de IL-4, IL-10 e IFN- γ , sendo as duas últimas em níveis semelhantes. Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa também observaram estímulo de resposta Th1 combinada com Th2 em camundongos imunizados com as proteínas OmpL1, Lsa44 e Lsa45 (FERNANDES et al., 2012, 2014). Resposta combinada de Th1 e Th2 também parece estar envolvida na proteção induzida por uma vacina de DNA baseada em LigA (FAISAL et al., 2008). Esse evento já foi observado em estudos *in vitro* e *in vivo* para a leptospira inteira (BROWN et al., 2003; MARANGONI et al., 2004; MERIEN; BARANTON; PEROLAT, 1997; NAIMAN et al., 2001; VERNEL-PAUILLAC; MERIEN, 2006), no entanto o mesmo perfil de resposta imune não foi observado nesse estudo quando as células dos animais imunizados com a rLIC11975 foram estimuladas *in vitro* com a bactéria. Por isso, parte desses efeitos pode ser em decorrência do hidróxido de alumínio utilizado como adjuvante, visto que esse é capaz de estimular ambos os tipos de resposta imune, Th1 e Th2 (REED et al., 2009). Por outro lado, é importante ressaltar que o efeito provocado pelas leptospiros vivas, na maioria das vezes, foi semelhante nos esplenócitos dos animais imunizados e não imunizados e as condições de cultivo, nesse caso, talvez precisem ser aprimoradas.

Figura 15 – Liberação de citocinas por esplenócitos de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes após estímulo *in vitro*

(A) rLIC11009. (B) rLIC11360. (C) rLIC11975. Os esplenócitos foram cultivados e estimulados por 48 horas com ConA (controle positivo, 5 μ g/mL), proteína recombinante (5 μ g/mL) ou *L. interrogans* sorovar Copenhageni M-20 (2×10^8). O sobrenadante livre de células foi coletado e analisado quanto aos níveis de citocinas liberados (IL-4, IL-10, TNF- α , INF- γ , IL-12) por ELISA. Para análise estatística, os níveis de citocinas liberados pelos esplenócitos dos camundongos cultivados com estímulo foram comparados com os níveis liberados pelos esplenócitos cultivados sem estímulo (RPMI) utilizando o teste *t*. A liberação de citocinas pelos esplenócitos primados e estimulados com a proteína ou leptospiras só foi considerada quando esses valores foram significativos em relação ao grupo dos animais controles (PBS). As barras representam a média dos níveis de citocinas em pg/mL $\pm$ dois desvios padrões, e são representativas de dois experimentos independentes.

3.7 Avaliação da expressão e localização das proteínas nativas na *Leptospira*

3.7.1 Avaliação da presença dos genes e de seus transcritos em dez sorovares de *leptospira*

De acordo com a composição antigênica dos epítomos de LPS expostos na superfície da *Leptospira* elas são classificadas em mais de 250 sorovares patogênicos e 60 sorovares saprofíticos (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Dada essa grande diversidade antigênica, foi avaliada *in vitro* a presença dos genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975, bem como sua expressão, em 10 sorovares de *Leptospira*.

Para avaliar a presença dos genes, DNAs de leptospiros (9 sorovares patogênicos e 1 saprofítico) foram extraídos e utilizados em PCR convencional empregando oligonucleotídeos sintéticos desenhados de acordo com o genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Quadro 3). A integridade das amostras foi avaliada utilizando oligonucleotídeos desenhados para o gene ribossomal 16S que, como pode ser observado na Figura 16, foi amplificado em todos os sorovares testados.

Ao continuar analisando a Figura 16, é possível observar que sequências correspondentes aos genes LIC11009 e LIC11360 amplificaram em todas as espécies e sorovares patogênicos testados. O gene LIC11975 foi detectado em quase todos os sorovares patogênicos, exceto na *L. kirschneri* sorovar Cynopteri. Uma banda pode ser visualizada na *L. biflexa* quando utilizado oligonucleotídeos desenhados para amplificação do gene LIC11009, entretanto essa banda se encontra em altura diferente das demais, indicando uma possível amplificação inespecífica. Uma banda correspondente ao gene LIC11360 pode ser observada nessa mesma espécie de leptospira, porém o servidor BLAST não encontrou nenhuma sequência similar a esse gene na *L. biflexa*, esse desacordo pode ser explicado por um provável anelamento dos oligonucleotídeos em uma região do genoma de baixa similaridade. Por outro lado, ao analisar o filograma (Figura 4B) realizado com a sequência de aminoácidos codificada por esse gene é possível notar uma pequena similaridade entre ele e uma sequência presente na *L. licerasiae* sorovar Varillal que é classificada filogeneticamente como intermediária (MATTHIAS et al., 2008).

Também há um desacordo entre o filograma do gene LIC11975 (Figura 4C) e a PCR realizada com DNA extraído da *L. biflexa* sorovar Patoc, em que não foi observada nenhuma amplificação. Contudo, a similaridade encontrada *in silico* é relativamente baixa (38%), fato que talvez possa justificar a discordância entre as duas análises.

Figura 16 – Amplificação de sequências correspondentes aos genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 em diferentes sorovares de *Leptospira*

O DNA extraído de culturas de leptospira foi analisado por PCR empregando oligonucleotídeos sintetizados de acordo com o genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Para avaliar a integridade do DNA obtido foram utilizados oligonucleotídeos desenhados para o gene 16S ribossomal. Os fragmentos resultantes da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com GelRedTM.

A avaliação da expressão dos genes em estudo nos 10 sorovares de *Leptospira* foi realizada por RT-qPCR. Essa técnica é uma evolução da técnica de PCR convencional que permite o monitoramento da amplificação das sequências nucleotídicas enquanto a reação está ocorrendo, possibilitando dessa forma a coleta dos dados ao longo da mesma (VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). Para isso, RNAs foram extraídos de culturas de leptospiros e transcritos em cDNA utilizando RT-PCR. Os cDNAs obtidos foram aplicados nas reações de RT-qPCR. Após o término de cada reação foram analisadas as curvas de dissociação, e todas apresentaram apenas um pico, mostrando a especificidade de cada par de oligonucleotídeos (Apêndice D).

Assim como na amplificação dos genes, para avaliação da expressão gênica a sequência do gene ribossomal 16S foi escolhida como controle endógeno. Genes ribossomais costumam ser altamente conservados entre as bactérias, e o mesmo foi observado para o gene 16S das leptospiros (MERIEN et al., 1992). Além disso, Carrillo-Cassas et al. (2008) demonstraram que a expressão desse gene é a mais estável frente a mudanças de temperaturas, recomendando a sua utilização como controle interno para qPCR. Na Figura 17 é possível observar a uniformidade nos níveis de expressão do gene 16S entre os diferentes sorovares de leptospira (RT+), característica desejável para um controle interno (STURZENBAUM; KILLE, 2001). Além disso, a expressão do gene constitutivo em todos os sorovares testados confirma a integridade das amostras. Os valores de C_T obtidos nas amostras RT- encontram-se numa faixa muito elevada, o que significa que a quantidade do alvo é muito pequena, próxima de uma cópia, e por isso foram desconsiderados. Nenhuma expressão foi observada no controle da reação, contendo todos os reagentes exceto cDNA (NTC). Esses resultados dão segurança para a utilização do gene 16S como normalizador, bem como para a utilização das amostras de cDNA nos ensaios posteriores.

Figura 17 – Níveis de expressão do gene ribossomal 16S em dez sorovares de leptospira

RNAs foram extraídos de culturas de leptospiros e transcritos em cDNA (RT+) por RT-PCR convencional. Amostras de RNA submetidas à RT-PCR sem a utilização da *SuperScript III RT* foram utilizadas como controle para contaminação com DNA genômico (RT-). As reações de RT-qPCR foram realizadas em placas ópticas de 96 poços utilizando 25 ng de cDNA, oligonucleotídeos sintéticos desenhados para o gene 16S, e o corante SYBR Green I para detecção dos DNAs dupla-fita formados. Controle da reação contendo todos os reagentes, exceto cDNA, foi realizado em paralelo (NTC). As barras representam os valores de C_T obtidos $\pm$ o desvio padrão de dois experimentos independentes.

Visto que as eficiências de amplificação dos oligonucleotídeos dos genes endógeno e alvos são equivalentes (Apêndice C), a expressão dos genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 nos diversos sorovares de leptospira foi normalizada em relação ao gene constitutivo 16S para em seguida ser comparada em relação à sua expressão na *L. interrogans* sorovar Copenhageni. A comparação foi feita em relação a esse sorovar por ele ser a base para nossos estudos, sendo o sorovar que foi utilizado para clonar os respectivos genes. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método $\Delta\Delta C_T$, um método que utiliza fórmulas aritméticas para alcançar o resultado da quantificação. Esse método é bastante útil especialmente quando é testado um grande número de alvos e/ou amostras, permitindo a economia de trabalho e reagentes.

A Figura 18 mostra que os três genes em estudo foram expressos em todos os sorovares de *L. interrogans* testados, sendo observada maior expressão na *L. interrogans* sorovar Hardjo, quando comparada com a *L. interrogans* sorovar Copenhageni, com destaque para o gene LIC11975. O gene LIC11009 também foi

expresso na *L. kirschneri* sorovares Cynopteri e Grippytyphosa, porém com uma expressão relativa 1000 vezes menor do que na *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Nenhuma expressão dos genes LIC11360 e LIC11975 foi observada nesses sorovares. A presença de bandas para os genes LIC11009 e LIC11360 no sorovar Panama foi por conta de contaminação genômica. Dessa forma, também não foram observadas expressões para os genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 nos sorovares Whitticombi, Panama e Patoc, bem como no controle NTC da reação (Figura 18B).

Os resultados obtidos estão de acordo com os resultados da amplificação, gênica em que o gene LIC11975 está ausente nos sorovares Cynopteri e Patoc, assim como o gene LIC11009 também está ausente nesse último sorovar. Por outro lado, estão divergentes com a análise de conservação *in silico* (Figura 4), em que sequências similares aos genes LIC11360 e LIC11975 foram encontradas na *L. kirschneri* Grippytyphosa. No entanto, é importante ressaltar que as sequências de aminoácidos utilizadas para realizar o alinhamento são geradas por tradução conceitual das sequências de nucleotídeos dos genes depositados em banco de dados e, portanto não implica que sua expressão ocorra na prática.

Figura 18 - Expressão dos genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 em diferentes sorovares de leptospira

A

B

RNAs foram extraídos de culturas de leptospiros e transcritos em cDNA por RT-PCR convencional. As reações de RT-qPCR foram realizadas empregando oligonucleotídeos sintéticos específicos para cada gene, 25 ng de cDNA e o corante SYBR Green I para detecção dos DNAs dupla-fita formados. Controle da reação contendo todos os reagentes, exceto cDNA, foi realizado em paralelo (NTC). O *fold change* foi calculado pelo método $\Delta\Delta C_T$ a partir dos valores de ΔC_T obtidos após normalização com o controle endógeno 16S. **(A)** As barras representam a média dos níveis de expressão relativa de cada gene nos diversos sorovares de leptospira em relação à *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M-20) $\pm$ o desvio padrão de dois experimentos independentes. **(B)** Os fragmento obtidos após a RT-qPCR foram corados com GelRedTM e visualizados em gel de agarose 4%.

Vários microrganismos tendem a regular a expressão de alguns genes a fim de se adaptarem às condições dos mais diversos ambientes. Esse fenômeno já foi descrito para alguns genes de leptospira quando expostos às mudanças de temperatura, pH e osmolaridade (ATZINGEN et al., 2008; LO et al., 2009; MATSUNAGA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Como

transcritos dos genes LIC11360 e LIC11975 não foram detectados nos sorovares Whitticombi, Cynopteri, Grippotyphosa, Panama e Patoc, essas bactérias foram cultivadas a 37 ou 39 °C, mimetizando estágio inicial e febril da infecção, respectivamente. Também foi realizado o cultivo desses sorovares em meio suplementado com 120 mM NaCl, na tentativa de simular as condições fisiológicas do hospedeiro. O gene 16S não apresentou muita variação nos seus níveis de expressão quando as bactérias foram cultivadas nas diferentes condições e por isso continuou sendo utilizado como normalizador (Figura 19A).

As mudanças nas temperaturas de cultivo influenciaram principalmente a expressão do gene LIC11009 (Figura 19B). *L. borgpetersenii* sorovar Whitticombi só expressou esse gene quando foi cultivada a 39 °C. Essa temperatura também afetou a expressão desse gene nos sorovares de *L. kirschneri*, diminuindo no sorovar Cynopteri e aumentando no sorovar Grippotyphosa. Esse mesmo efeito foi observado quando esses sorovares foram cultivados a 37 °C, temperatura que também favoreceu a expressão do gene LIC11009 na *L. noguchii* Panama. Esse sorovar expressou o gene LIC11360 somente a 37 °C. Os genes LIC11360 e LIC11975 também foram expressos quando a *L. kirschneri* Cynopteri foi cultivada em temperaturas próximas do hospedeiro. A expressão desse último gene foi surpreendente, visto que os resultados da amplificação gênica indicavam apenas uma amplificação inespecífica (Figura 16), no entanto a banda obtida deve ser, na realidade, por conta de um anelamento com uma sequência de baixa similaridade.

A osmolaridade também influenciou a expressão dos genes. Os sorovares Cynopteri e Panama expressaram o gene LIC11360 quando foram cultivados com NaCl. *L. kirschneri* Cynopteri também expressou o gene LIC11975, porém reduziu sua expressão do LIC11009 quando cultivada nessas condições. Por outro lado, os sorovares Grippotyphosa e Panama aumentaram a expressão do gene LIC11009 na presença de osmolaridade fisiológica. Esses resultados demonstram que as condições ambientais influenciam a expressão desses genes.

Figura 19 – Expressão dos genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 em leptospiros mantidas em diferentes condições de cultivo

A

B

C

cDNAs foram obtidos por RT-PCR convencional a partir de RNAs extraídos de leptospiros cultivadas, por 16 horas, a 28, 37 ou 39 °C, ou em meio EMJH suplementado com 120 mM NaCl (28 °C). Nas reações de RT-qPCR foram empregados oligonucleotídeos específicos para cada gene, 25 ng de cDNA e corante SYBR Green I. Controle da reação contendo todos os reagentes, exceto cDNA, foi realizado em paralelo (NTC). **(A)** As barras representam os valores de C_T obtidos para o gene 16S $\pm$ o desvio padrão de dois experimentos independentes. **(B)** As barras representam os valores de ΔC_T de cada gene $\pm$ o desvio padrão de dois experimentos independentes. **(C)** Os fragmentos obtidos após a RT-qPCR foram corados com GelRedTM e visualizados em gel de agarose 4%.

Com a finalidade de especular um pouco mais a expressão dos genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 em condições de infecção, foram utilizados cDNAs de duas cepas virulentas de *L. interrogans*, L1-130 e LPF. A quantificação relativa foi feita em relação às cepas correspondentes atenuadas M-20 e Pomona, respectivamente. Somente a expressão do gene LIC11360 foi maior nas duas cepas virulentas do que nas atenuadas. O gene LIC11009 também teve maior expressão na cepa LPF, quando comparada com a Pomona, mas o mesmo não foi observado para as cepas M-20 e L1-130. No entanto, todos os genes do estudo foram expressos pelas cepas virulentas.

Figura 20 – Expressão dos genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 em cepas virulentas de leptospira

As reações de RT-qPCR foram realizadas empregando oligonucleotídeos, 25ng de cDNA e o corante SYBR Green I. Controle da reação contendo todos os reagentes, exceto cDNA, foi realizado em paralelo (NTC). O *fold change* foi calculado pelo método $\Delta\Delta C_T$ a partir dos valores de C_T obtidos após normalização com o controle endógeno 16S. As barras representam a média dos níveis de expressão relativa de cada gene nas cepas virulentas de leptospira em relação às cepas atenuadas $\pm$ o desvio padrão de três experimentos independentes.

3.7.2 Distribuição das proteínas nativas em dez sorovares de leptospira

A transcrição de um gene não implica, necessariamente, em sua tradução. Por isso, no intuito de avaliar se as proteínas correspondentes aos genes em estudo estão sendo expressas pelas leptospiros, extratos proteicos de 10 sorovares diferentes foram separados por SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. A detecção das proteínas nativas correspondentes aos respectivos genes foi realizada utilizando antissoros produzidos em camundongos contra as

proteínas recombinantes correspondentes; a própria proteína recombinante foi utilizada como controle positivo da reação.

Somente a LIC11009 foi detectada em extratos de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M-20), *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae (RGA), *L. interrogans* sorovar Canicola (HOND UTRECHT IV), *L. interrogans* sorovar Pomona (Pomona) e *L. interrogans* sorovar Hardjo (Hardjo-prajitno) (Figura 21), o que está de acordo com os resultados obtidos no estudo da presença dos transcritos (Figura 18). As outras proteínas nativas não foram detectadas nos extratos bacterianos, havendo reatividade do anticorpo somente com as proteínas recombinantes (dados não mostrados). Esse resultado pode ser devido ao fato de essas proteínas estarem presentes na leptospira em um número muito baixo de cópias. Estudos proteômicos quantitativos realizados por Malmström et al. (2009) estimaram 2566 cópias/leptospira da proteína LIC11009. As proteínas codificadas pelos genes LIC11360 e LIC11975, embora tenham sido identificadas nesse estudo, não puderam ser quantificadas por se encontrarem em número abaixo do limite de detecção.

Figura 21 – Expressão da proteína LIC11009 em diferentes sorovares de *Leptospira*

Extratos proteicos de diversos sorovares de *Leptospira* foram separados por SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. As proteínas nativas correspondentes ao gene LIC11009 foram detectadas utilizando antissoro específico produzido em camundongos diluído 1:50. A reatividade foi revelada com ECL e detectada pelo equipamento GelLogic 2200 Pro (Carestream). A proteína recombinante foi utilizada como controle positivo.

3.7.3 Expressão das proteínas em estudo durante a infecção

Com a finalidade de identificar se as proteínas em estudo são expressas pelas leptospirosas durante a infecção e possuem a capacidade de promover uma resposta imune no indivíduo infectado, foi realizado um ELISA para detecção de IgG no soro de humanos diagnosticados com leptospirose pelo MAT. Para isso, foram utilizadas, inicialmente, 16 amostras distintas de soros de pacientes coletadas durante a fase convalescente da doença (MAT positivo).

As amostras foram consideradas reativas quando apresentaram valores maiores do que o estabelecido pelo *cutoff*, que foi definido utilizando 2 *pools* de soros humanos normais comerciais (Sigma – Aldrich e Complement Technology). Desse modo, as três proteínas recombinantes apresentaram reatividade com as amostras de soros dos pacientes, sendo o maior número de respondedores para a rLIC11009, com 93,8%, seguido da rLIC11360, com 68,8%, e da rLIC11975, com 62,5% (Figura 22A).

Como hamsters são suscetíveis à infecção por *Leptospira* são, portanto, considerados modelo animal para a leptospirose (HAAKE, 2006). Por essa razão, também foi avaliado o reconhecimento imune das proteínas recombinantes por IgG presente nos soros de hamsters infectados experimentalmente. Essa análise foi realizada por ELISA utilizando 44 soros de animais positivos para leptospirose (segundo o MAT). Para o cálculo do *cutoff* foi definido o percentil 96 de 4 soros de hamsters não infectados (normais). Assim como para os soros de humanos, o número de animais respondedores foi maior para a rLIC11009, com 31,8%, seguida da rLIC11360, com 18,8% de respondedores (Figura 22B). A proteína rLIC11975 não reagiu com nenhum soro desses animais (dados não mostrados).

Figura 22 – Reatividade das proteínas recombinantes com soros de humanos (A) e de hamsters (B) infectados com leptospira

16 amostras de soros de pacientes diagnosticados com leptospirose em fase convalescente (MAT+) **(A)** e 44 amostras de soros de hamsters infectados experimentalmente com *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Fiocruz L1-130) e diagnosticados pelo MAT **(B)** foram analisadas quanto à presença de IgG contra cada proteína recombinante. A reatividade dos soros foi testada por ELISA utilizando-os na diluição 1:200. O valor do *cutoff* para cada proteína recombinante foi determinado como o percentil 96 da média das absorvâncias obtidas para dois *pools* de soros humanos normais comerciais **(A)** ou 4 soros de animais não infectados **(B)** e está representado pela linha horizontal. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Tendo em vista que as proteínas rLIC11009 e rLIC11360 foram as mais reativas, foi avaliado se a combinação das duas poderia resultar em um efeito sinérgico positivo. Primeiramente foi estabelecido novo *cutoff*, utilizando uma mistura com quantidades iguais das duas proteínas e os mesmos *pools* de soros normais comerciais. Em seguida, a reatividade das duas proteínas, juntas e isoladas, foi avaliada contra um novo painel de 22 soros pareados (MAT positivo e MAT negativo). As proteínas isoladas mantiveram seu percentual de respondedores para os pacientes em fase convalescente da doença, que foi 90,9% para rLIC11009 e 50% para rLIC11360. Em relação às amostras coletadas na fase aguda da leptospirose, somente a rLIC11009 apresentou reatividade relevante, com 54,5% de respondedores. No entanto, ao combinar as duas proteínas, a reatividade diminuiu significativamente, tanto em relação às amostras da fase aguda como da fase convalescente, com percentual de respondedores caindo para 0,05 e 36,4%, respectivamente. Porém, é importante observar que os valores de absorvância se mantiveram em uma mesma faixa e a queda no percentual de respondedores foi, principalmente, pelo aumento no valor do *cutoff*, que foi acima de 0,2 (Figura 23).

Os valores percentuais de respondedores para as proteínas em estudo talvez não sejam significativamente relevantes a ponto de elas serem propostas

como marcadores de diagnóstico, entretanto sugerem fortemente que todas elas estão sendo expressas por leptospiros em algum momento durante a infecção.

Figura 23 – Efeito sinérgico das proteínas rLIC11009 e rLIC11360 na reatividade com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose

Vinte e duas amostras de soros pareados de pacientes diagnosticados com leptospirose (MAT+ e MAT-) foram analisadas quanto à presença de IgG contra as proteínas recombinantes isoladas e combinadas por meio de ELISA. Os soros foram testados na diluição de 1:200. O valor do *cutoff* para as proteínas recombinantes isoladas e combinadas foi definido como o percentil 96 da média dos valores de absorbância de dois *pools* de soros humanos normais comerciais, e está representado por uma linha horizontal. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

3.7.4 Expressão das proteínas LIC11009, LIC11360 e LIC11975 na superfície da leptospira

Proteínas correspondentes aos genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 são preditas, pelos programas PSORT (NAKAI; KANEHISA, 1991; NAKAI; HORTON, 1999) e CELLO (YU; LIN; HWANG, 2004; YU et al., 2006), como de membrana

externa. Proteínas com essa localização podem apresentar grande potencial para formulação de uma vacina e/ou teste diagnóstico, pois são as principais mediadoras na relação patógeno-hospedeiro, estando envolvidas em processos de colonização e estimulação do sistema imunológico. Para confirmar experimentalmente se as proteínas do estudo estão, de fato, ali localizadas, foram realizados dois ensaios diferentes: digestão com PK e IF. Em ambos os ensaios foram utilizadas as proteínas LipL32 e DnaK como controles de membrana externa e integridade celular, respectivamente, pois LipL32 é a proteína majoritária da membrana da leptospira (HAAKE et al., 2000) e DnaK é uma proteína citoplasmática dessa bactéria (STAMM et al., 1991).

A PK é uma serino protease de amplo espectro produzida pelo fungo *Tritirachium album* que tem a capacidade de clivar especificamente ligações peptídicas adjacentes ao grupo carboxílico de aminoácidos alifáticos e aromáticos (EBELING et al., 1974). Essa enzima possui atividade proteolítica tanto em proteínas nativas como desnaturadas e por isso tem sido utilizada para digestão de proteínas em geral, principalmente na remoção de contaminantes e nucleases em preparações para purificação de ácidos nucleicos.

O emprego da PK no intuito de avaliar a exposição de proteínas na superfície bacteriana já foi realizado para diversas bactérias, inclusive outras espiroquetas (BRYKSIN et al., 2010; COX et al., 2010). O tratamento de leptospiros com a PK para avaliar a exposição das proteínas na superfície da membrana já foi descrito por Oliveira et al. (2010) e Pinne e Haake (2009). A detecção das proteínas acessadas pela PK pela técnica de ELISA foi descrita pela primeira vez por Domingos et al. (2012) e foi empregada neste estudo devido a sua maior sensibilidade em relação ao imunoblotting.

Para esse ensaio, *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M-20) vivas foram tratadas com PK por diferentes períodos de tempo e a suscetibilidade das proteínas foi avaliada utilizando antissoros produzidos contra as proteínas recombinantes. A Figura 24 mostra redução estatisticamente significativa do sinal das três proteínas, em relação ao controle (0 minuto), após 60 minutos de tratamento, restando cerca de 53% de LIC11009, 55% de LIC11360 e 72% de LIC11975. A maior porcentagem de LIC11975 pode ser devido ao fato dessa proteína possuir uma região transmembrana que não pode ser acessada pela PK. A proteólise da LipL32 demonstra a acessibilidade da PK às proteínas da superfície bacteriana, enquanto

que a ausência de sinal para a DnaK demonstra a integridade das leptospiiras e consequente inacessibilidade das proteínas citoplasmáticas durante o tratamento com a PK.

Figura 24 – Digestão de proteínas de superfície com proteinase K

L. interrogans sorovar Copenhageni (M-20) viáveis foram incubadas com 25 µg/mL de PK nos tempos indicados (em minutos). As bactérias foram centrifugadas, lavadas, ressuspensas em PBS /s e imobilizadas em placas de microdiluição (10^7 células/poço). Antissoro policlonal contra as proteínas rLIC11009, rLIC11360 ou rLIC11975 foram adicionados. Antissoros contra as proteínas de membrana externa, LipL32, e citoplasmática, DnaK, foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Brancos contendo todos os componentes da reação, exceto antissoro contra as proteínas, foram realizados em paralelo. Leituras foram realizadas em 492 nm. As barras representam as médias das absorbâncias $\pm$ três desvios padrões para cada ponto e são representativas de dois experimentos independentes. Para análise estatística os valores de DO de 0 h e das horas de tratamento com PK foram comparadas pelo teste *t* bicaudal (* $P < 0,05$).

Para o ensaio de IF, leptospiiras foram fixadas com paraformaldeído e em seguida incubadas com antissoro produzido contra a proteína recombinante correspondente. Para visualização das proteínas detectadas pelo antissoro foi utilizado anti-IgG conjugado ao FITC. Iodeto de propídeo foi utilizado para marcar o material genético da leptospira, permitindo sua visualização em vermelho. A sobreposição das imagens permite observar a presença das proteínas na leptospira. A presença de sinal verde quando utilizado antissoro anti-LipL32, e ausência quando utilizado antissoro de animais imunizados com DnaK recombinante ou não imunizados (PBS), mostram que as proteínas em estudo estão sendo expressas na superfície da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M-20) (Figura 25).

Figura 25 – Localização das proteínas LIC11009, LIC11360 e LIC11975 por imunofluorescência

L. interrogans sorovar Copenhageni (M-20) foram fixadas com paraformaldeído 2% e em seguida incubadas com antissoro contra proteína recombinante diluído 1:50. A visualização das proteínas nativas foi realizada por fluorescência verde, utilizando anti-IgG de camundongo conjugado ao FITC. As leptospiros foram marcadas em vermelho com iodeto de propídeo (IP). LipL32 e DnaK foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. Antissoro de camundongos inoculados com PBS também foi utilizado como controle negativo. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência confocal e podem ser visualizadas isoladamente (IP e FITC) e sobrepostas.

3.8 Adesão das proteínas recombinantes aos componentes da MEC

A adesão dos patógenos ao tecido do hospedeiro se dá pela interação de proteínas expostas em sua superfície com componentes da MEC exposta por algum trauma, ou ainda pelo contato direto com a mucosa. Esse tipo de interação pode contribuir para uma colonização primária do hospedeiro e tem sido bem reportada para vários patógenos (CHAGNOT et al., 2012; LJUNGH; WADSTROM, 1996).

A MEC é composta basicamente de colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas e integrinas. A laminina é uma glicoproteína encontrada principalmente na membrana basal, enquanto que a vitronectina e a fibronectina são glicoproteínas que compõem a matriz extracelular e também o plasma. A elastina é essencial para a elasticidade dos tecidos e é encontrada em abundância na pele, pulmões e vasos sanguíneos, dentre outros tecidos.

Os mecanismos de invasão e colonização utilizados pelas leptospiros ainda não são totalmente conhecidos. No entanto, diversas adesinas de leptospira vêm sendo descritas nos últimos anos (FERNANDES et al., 2014; VIEIRA et al., 2014), demonstrando o quanto o evento de adesão às células do hospedeiro é crítico para o estabelecimento da infecção por essas bactérias.

Considerando que as proteínas expostas na superfície bacteriana são as responsáveis pela sua aderência aos tecidos do hospedeiro, e que as proteínas codificadas pelos genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 provavelmente estão expostas na superfície das leptospiros, foi avaliada a capacidade de elas se ligarem aos componentes da MEC e com isso possuírem um possível papel na colonização do hospedeiro. Para isso, laminina, colágeno tipo I e tipo IV, fibronectina celular, vitronectina, e elastina foram imobilizados em placas de microdiluição, e em seguida a adesão das proteínas recombinantes foi avaliada por ELISA. Fetuína, gelatina e BSA foram utilizadas como controles para ligações inespecíficas.

Como demonstrado na Figura 26A, as proteínas rLIC11009, rLIC11360 e rLIC11975 exibiram adesão estatisticamente significativa à laminina ($P < 0.05$) e por isso foram nomeadas respectivamente, Lsa26, Lsa23 e Lsa36 (*Leptospiral surface adhesin* e seu respectivo peso molecular) (SIQUEIRA et al., 2013). A Lsa23 também demonstrou ligação significativa com o colágeno I. Nenhuma interação estatisticamente significativa foi observada com as três proteínas recombinantes e os outros componentes da MEC, bem como com as proteínas controle BSA, fetuína e

gelatina. Para confirmar os resultados obtidos foi realizado o mesmo procedimento utilizando o anticorpo monoclonal antipoli-histidina na detecção de uma possível adesão (Figura 26B), e somente houve discordância dos resultados obtidos entre a interação da Lsa23 e o colágeno I, que não pode ser detectada nesse segundo ensaio.

Figura 26 – Adesão das proteínas recombinantes aos componentes da MEC

Um micrograma de cada componente da MEC foi imobilizado em placa de ELISA, seguida de incubação com 1 µg de cada proteína recombinante. BSA, fetúina e gelatina foram utilizadas como controles para ligações inespecíficas. A detecção da adesão foi feita com **(A)** anticorpo policlonal produzido contra a proteína recombinante ou **(B)** anticorpo monoclonal antipoli-histidina. As barras representam as médias das absorbâncias em 492 nm ± três desvios padrões para cada proteína e são representativas de dois experimentos independentes. Para análise estatística, a interação das proteínas recombinantes com as macromoléculas foi comparada em relação a sua interação com a fetúina pelo teste *t* bicaudal (* $P < 0,05$).

A especificidade da adesão de cada proteína foi avaliada de maneira quantitativa, e uma ligação dose-dependente e saturável entre as proteínas recombinantes e a laminina foi observada em razão da concentração das mesmas (Figura 27). A interação entre a Lsa23 e o colágeno I não foi confirmada por esse ensaio, assim como não foi detectada pelo anticorpo monoclonal antipoli-histidina (Figura 26B) sendo, portanto descartada. Os níveis de saturação da ligação com a laminina foram alcançados com 0,2; 0,6 e 2,5 μM de Lsa23, Lsa36 e Lsa26, respectivamente (Figura 27), com destaque para a alta afinidade da Lsa23 que apresentou uma constante de dissociação de $25,1 \pm 4,1 \text{ nM}$, um valor da mesma magnitude de uma adesina já descrita, a Lsa66 (OLIVEIRA et al., 2011). Os valores de K_D da Lsa26 e da Lsa36 são similares aos descritos para outras proteínas como LenB, TlyC, OmpL37, Lsa20, Lsa33, Lsa25, e Lsa30, e podem ser visualizados logo abaixo no Quadro 7 (CARVALHO et al., 2009; DOMINGOS et al., 2012; MENDES et al., 2011; PINNE; CHOY; HAAKE, 2010; SOUZA et al., 2012; STEVENSON et al., 2007).

Figura 27 – Especificidade da adesão das proteínas recombinantes à laminina

A adesão das proteínas recombinantes à laminina foi detectada com antissoro policlonal específico para cada proteína recombinante. A especificidade dessa interação foi avaliada utilizando concentrações crescentes das proteínas. Fetuína foi utilizada como controle negativo. Cada ponto foi realizado em triplicata e expresso como a média dos valores das absorbâncias em 492 nm $\pm$ o desvio padrão de cada ponto. As constantes de dissociação foram calculadas com base nos dados obtidos no ELISA e podem ser visualizadas no Quadro 7.

Quadro 7 – Constante de Dissociação (K_D) para a adesão das proteínas recombinantes com a laminina

Proteínas	K_D (nM)
Lsa26	952,2 ± 418,9
Lsa23	25,1 ± 4,1
Lsa36	120,8 ± 97,6

Com o objetivo de detalhar um pouco mais a adesão das proteínas recombinantes à laminina, foi avaliado se o bloqueio delas com soro homólogo causaria alguma interferência nessa interação. A Figura 28A mostra que a ligação das proteínas recombinantes com a laminina foi inibida parcialmente pelo antissoro correspondente, sendo quase que total para a Lsa26, a qual somente uma pequena porcentagem (7,9%) manteve a capacidade de ligação com a laminina. Esse resultado sugere que regiões imunogênicas são de grande importância para a ligação dessa proteína com a laminina, enquanto que a participação de epítomos não imunogênicos parece predominar na interação das proteínas Lsa23 e Lsa36 com esse mesmo componente.

O aquecimento de proteínas a temperaturas acima de 60 °C pode levar à desnaturação proteica, o que significa perda da sua estrutura nativa. Tendo em vista que as proteínas recombinantes se encontram estruturadas (Figura 11), foi avaliada a ligação delas com a laminina após terem sido aquecidas a 96 °C por 10 minutos, com o objetivo de avaliar a importância da estrutura proteica nessa interação. Esse processo desnaturante aboliu quase que totalmente a adesão entre a Lsa23 e a laminina (Figura 28B), sugerindo que epítomos conformacionais estejam envolvidos nessa interação. Por outro lado, a interação das proteínas Lsa26 e Lsa36 com a laminina foi potencializada pelo efeito desnaturante (Figura 28B), o qual possivelmente expôs mais epítomos de ligação não lineares.

Figura 28 – Ligação das proteínas recombinantes com a laminina após bloqueio com antissoro policlonal (A) ou desnaturação (B)

Um micrograma de laminina foi imobilizado em uma placa de ELISA, seguida de incubação com 1 µg de cada proteína recombinante bloqueada previamente, por 1 hora a 37 °C, com antissoro policlonal específico para a proteína **(A)** ou desnaturada por aquecimento a 96 °C por 10 minutos **(B)**. A detecção da adesão foi feita com anticorpo monoclonal antipoli-histidina **(A)** ou antissoro policlonal produzido contra a proteína **(B)**. As barras representam a porcentagem de ligação das proteínas recombinantes com a laminina $\pm$ três desvios padrões e são representativas de dois experimentos independentes. Para análise estatística, a interação das proteínas recombinantes que sofreram algum tratamento prévio foi comparada pelo teste *t* bicaudal com a sua interação sem terem sofrido algum tratamento (* $P < 0,05$).

A fim de dar prosseguimento na caracterização dessas ligações, como a laminina é uma glicoproteína, foi avaliada a participação dos seus carboidratos na interação com as proteínas recombinantes por meio da sua oxidação com metaperiodato de sódio. Esse sal apresenta propriedades oxidantes que atuam especificamente no grupamento hidroxil dos carboidratos, sem comprometer a estrutura peptídica da glicoproteína (WOODWARD; YOUNG; BLOODGOOD, 1985). O efeito oxidante na ligação da laminina com as proteínas Lsa26, Lsa23 e Lsa36 foi dose-dependente, e uma redução significativa dessas ligações já pode ser observada com apenas 5 mM de metaperiodato de sódio (Figura 29), demonstrando que os resíduos de carboidratos da laminina provavelmente são de grande importância para que essa ligação ocorra.

Figura 29 – Envolvimento dos resíduos de açúcar da laminina na sua interação com as proteínas recombinantes

Laminina (250 ng) foi imobilizada em placa de microdiluição e tratada com concentrações crescentes de metaperiodato de sódio (5-100 mM) por 1 hora, a temperatura ambiente, no escuro, antes de ser incubada com 500 ng de proteína recombinante. Cada ponto representa a porcentagem de ligação de cada proteína com a laminina $\pm$ três desvios padrões, e são representativos de dois experimentos independentes. Para os cálculos estatísticos, a adesão das proteínas recombinantes à laminina tratada com metaperiodato de sódio foi comparada com sua adesão à laminina não tratada (0 mM), por meio do teste *t* de Student (* $P < 0,05$).

Nosso grupo de pesquisa descreveu a primeira proteína de leptospira ligante de laminina, a Lsa24 (BARBOSA et al., 2006). Posteriormente várias outras adesinas foram descritas (FERNANDES et al., 2014; VIEIRA et al., 2014), indicando que a leptospira possui um repertório redundante de moléculas de adesão que provavelmente devem fazer parte de suas estratégias de invasão e colonização do hospedeiro. Os resultados obtidos indicam que as proteínas Lsa26, Lsa23 e Lsa36 fazem parte desse grande repertório de adesinas.

3.9 Interação das proteínas recombinantes com componentes do plasma humano

A interação de algumas proteínas com os componentes do plasma do hospedeiro pode auxiliar o patógeno na evasão do sistema imune. Já foi demonstrado que a *L. interrogans* é capaz de se ligar ao PLG, C4BP, fator H e fibrinogênio por meio de proteínas que atuam como receptores (BARBOSA et al., 2009; VERMA et al., 2006; VIEIRA et al., 2009).

O PLG é o zimógeno da plasmina, uma serino protease responsável pela degradação de diversos substratos, incluindo o coágulo de fibrina, o tecido conjuntivo e componentes da matriz extracelular (ANGLES-CANO; ROUY; LIJNEN, 1992; PONTING; MARSHALL; CEDERHOLM-WILLIAMS, 1992). Vários receptores

de PLG já foram identificados em diversos patógenos, como a enolase de *Streptococcus* (PANCHOLI; FISCHETTI, 1998) e as proteínas OspA e OspC de *Borrelia burgdorferi* (FUCHS et al., 1994; HU et al., 1995; KLEMPNER et al., 1995). Verma et al. (2010) demonstraram que a proteína LenA de *L. interrogans* é um receptor de superfície para PLG humano. Atualmente diversos receptores do PLG já foram identificados em *L. interrogans* (FERNANDES et al., 2012, 2014; MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; VIEIRA et al., 2010).

O fator H e o C4BP são proteínas regulatórias do sistema complemento. O fator H é uma proteína plasmática de 150 kDa que está envolvida na regulação negativa da via alternativa do sistema complemento; e o C4BP uma glicoproteína plasmática de 570 kDa que está envolvida na regulação negativa da via clássica e/ou lecitina desse sistema. Ambos interferem na formação e regeneração da C3 convertase e atuam como cofator da serino protease fator I na inativação proteolítica do C3b e C4b, respectivamente (BLOM, 2002; GIGLI; FUJITA; NUSSENZWEIG, 1979).

Para escapar da ação do sistema complemento patógenos sequestram proteínas reguladoras desse sistema ou diminuem a ativação do mesmo (BLOM, 2002; LINDAHL; SJOBRING; JOHNSON, 2000). Hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis* (BERGGARD et al., 1997), porinas (Por 1A e Por 1B) de *N. gonorrhoeae* (RAM et al., 2001), proteínas *immunoglobulin-binding* de *S. pyogenes* (THERN et al., 1995) e proteínas de superfície aquisidoras de reguladores do complemento (CRASPs) de *B. burgdorferi* (KRAICZY et al., 2002) são exemplos de proteínas que se ligam a reguladores do sistema complemento. O nosso grupo identificou três proteínas de leptospira capazes de se ligarem ao C4BP, Lsa33, Lsa25 (DOMINGOS et al., 2012) e Lsa30 (SOUZA et al., 2012). As proteínas LigA, LigB, e LcpA também se mostraram capazes de se ligar a esse componente (BARBOSA et al., 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; CHOY et al., 2007). Alguns ligantes do fator H e do FHR-1 também foram identificados para a leptospira (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; CHOY, 2012; STEVENSON et al., 2007; VERMA et al., 2006). Desse modo, a resistência das leptospiros patogênicas ao soro parece estar fortemente relacionada à sua capacidade de se ligar ao fator H e ao C4BP (BARBOSA et al., 2009; MERI et al., 2005).

Fibrinogênio também é uma glicoproteína plasmática que atua nas etapas finais da coagulação, apresentando importante papel na formação dos trombos.

Diversas proteínas ligantes do fibrinogênio já foram descritas para vários patógenos de importância médica, como *Staphylococcus aureus* (FLICK et al., 2013) e as espiroquetas *Treponema pallidum* (HOUSTON et al., 2011) e *T. denticola* (BAMFORD et al., 2007; EDWARDS et al., 2005). Recentemente foi relatada a interação das proteínas LigA, LigB (CHOY et al., 2007; CHOY et al., 2011; LIN et al., 2011) e OmpL37 (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010) com o fibrinogênio. Esse tipo de interação poderia ajudar esses microrganismos a sobreviverem e se disseminarem no hospedeiro (RIVERA et al., 2007).

Nesse sentido, decidimos avaliar se as proteínas Lsa26, Lsa23 e Lsa36 também possuem a capacidade de interagir com os componentes do plasma humano *in vitro*. Para isso, os componentes foram imobilizados em uma placa de microdiluição e posteriormente incubados com as proteínas recombinantes. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 30.

As três proteínas recombinantes foram capazes de se ligar ao PLG humano ($P < 0.05$), enquanto que Lsa23 e Lsa36 também se ligaram à fibronectina plasmática e ao fibrinogênio ($P < 0.05$). Além disso, Lsa23 interagiu com as proteínas regulatórias do sistema complemento fator H e C4BP ($P < 0.05$). Nenhuma das proteínas recombinantes interagiu com as proteínas controle BSA, fetuína e gelatina (Figura 30A). Os resultados foram confirmados por um ELISA realizado com anticorpo monoclonal antipoli-histidina (Figura 30B).

Figura 30 - Interação das proteínas recombinantes com componentes do plasma humano

Um micrograma de cada componente foi imobilizado em uma placa de microdiluição, seguida de incubação com um micrograma de cada proteína recombinante. BSA, fetuína e gelatina foram utilizadas como controles negativos. A detecção da ligação foi feita com **(A)** antissoro policlonal produzido contra a proteína recombinante ou **(B)** anticorpo monoclonal antipoli-histidina. As barras representam as médias das absorbâncias em 492 nm $\pm$ três desvios padrões para cada proteína e são representativas de dois experimentos independentes. Para análise estatística, a interação das proteínas recombinantes com os componentes foi comparada em relação a sua interação com a fetuína pelo teste *t* bicaudal (* $P < 0,05$).

A especificidade das ligações entre as proteínas recombinantes e a fibronectina plasmática, o PLG, C4BP e fibrinogênio foram avaliadas por uma curva de dose-resposta (Figura 31). Ligações dose-dependentes e saturáveis foram observadas em razão das concentrações das proteínas. As constantes de dissociação foram calculadas com base nos dados obtidos no ELISA e estão apresentadas no Quadro 8. Interessante ressaltar a afinidade da Lsa23 com o C4BP, que foi de $17,6 \pm 3,5$ nM, mesma magnitude da relatada para a LigB (CHOY, 2012).

Como pode ser visualizado na Figura 32, a interação da Lsa23 com o fator H também foi dose-dependente, porém a saturação não pode ser alcançada até 6 μ M da proteína recombinante, concentração máxima obtida para essa proteína, com uma DO_{492nm} abaixo de 0,5.

Figura 31 - Especificidade da interação das proteínas recombinantes com componentes do plasma humano

(A) e (B) Fibronectina plasmática. (C) Plasminogênio. (D) C4BP. (E) Fibrinogênio. Um micrograma de cada componente foi imobilizado em placa de microdiluição e incubado com concentrações crescentes da proteína correspondente. A ligação foi detectada com antissoro policlonal específico para cada proteína recombinante. Fetuina foi utilizada como controle negativo. Cada ponto foi realizado em triplicata e expresso como a média dos valores das absorbâncias em 492 nm $\pm$ o desvio padrão de cada ponto. As curvas resultantes são representativas de dois experimentos independentes. As constantes de dissociação foram calculadas com base nos dados obtidos no ELISA e podem ser visualizadas no Quadro 8.

Figura 32 – Interação dose-dependente da Lsa23 com o fator H

(A) anticorpo policlonal anti-Lsa23. **(B)** anticorpo monoclonal antipoli-histidina. Um micrograma de fator H foi imobilizado em placa de microdiluição, seguida de incubação com diferentes concentrações de Lsa23 (0-6 μM). Fetuína foi utilizada como controle negativo para ligações inespecíficas e para análise estatística por comparação pelo teste *t* bicaudal (* $P < 0,05$). As barras representam as médias das absorvâncias em 492 nm $\pm$ três desvios padrões para cada condição e são representativas de dois experimentos independentes.

A interação das proteínas recombinantes com componentes do plasma humano também foi avaliada após elas serem bloqueadas com o antissoro policlonal correspondente e após terem sido aquecidas a 96 °C por 10 minutos, exatamente como realizado na caracterização da ligação com a laminina (Figura 33). Antissoro homólogo não bloqueou totalmente a interação da Lsa23 com o PLG (Figura 33C), bem como da Lsa36 com a fibronectina plasmática (Figura 33E), sugerindo que regiões não imunogênicas devem estar envolvidas nessas ligações. Por outro lado, quando a proteína Lsa26 foi bloqueada com o antissoro específico, a sua interação com o PLG foi quase que totalmente inibida (Figura 33A), assim como para a Lsa36 (Figura 33E). As interações entre a Lsa23 e o fibrinogênio, C4BP e fator H também foram inibidas quase que totalmente quando ela foi bloqueada pelo antissoro policlonal, enquanto que o bloqueio da ligação dessa proteína com a fibronectina plasmática foi total (Figura 33C). A ligação da Lsa36 com o fibrinogênio também foi inibida totalmente (Figura 33E) pelo antissoro homólogo. Esses resultados demonstram que provavelmente regiões imunogênicas apresentam grande importância para essas interações.

O processo desnaturante foi capaz de inibir a interação entre a Lsa26 e o PLG, porém em porcentagem quase que inexpressiva (7,5%) (Figura 33B), sugerindo que epítomos de ligação conformacionais tenham pouca importância nessa interação. As ligações da proteína recombinante Lsa23 com a fibronectina

plasmática, fibrinogênio e C4BP foram reduzidas significativamente pelo processo desnaturante, com destaque para a interação Lsa23-fibrinogênio em que somente 23,7% da proteína mantiveram a capacidade de interagir com o componente; nesse caso epítomos conformacionais provavelmente estão envolvidos na ligação dessa proteína com esses ligantes. Já em relação ao fator H e PLG, epítomos não conformacionais são os principais envolvidos na interação proteína-componente (Figura 33D). Em relação à proteína Lsa36, o processo de desnaturação teve efeito inibitório somente na sua interação com o fibrinogênio; na ligação com o PLG o efeito foi oposto, aumentando a interação proteína-componente, provavelmente devido à exposição de epítomos não conformacionais de ligação (Figura 33F).

Figura 33 – Interação das proteínas recombinantes com componentes do plasma humano após bloqueio com antissoro policlonal ou desnaturação

Um micrograma de cada componente foi imobilizado em placa de microdiluição, seguida de incubação com um micrograma de cada proteína recombinante bloqueada previamente, por 1 hora a 37 °C, com antissoro policlonal correspondente (**A, C, E**) ou desnaturada, por aquecimento a 96 °C, por 10 minutos (**B, D, F**). A detecção da adesão foi feita com anticorpo monoclonal antipoli-histidina (**A, C, E**) ou antissoro policlonal produzido contra a proteína (**B, D, F**). As barras representam a porcentagem de ligação das proteínas recombinantes aos componentes plasmáticos $\pm$ três desvios padrões e são representativas de dois experimentos independentes. Para análise estatística, a interação das proteínas recombinantes que sofreram algum tratamento prévio foi comparada, pelo teste *t* bicaudal, com a sua interação sem terem sofrido algum tratamento (* $P < 0,05$).

Assim como a laminina, a fibronectina plasmática, o fibrinogênio, C4BP e fator H também são glicoproteínas, por isso foi investigada a participação de seus carboidratos na interação com as proteínas recombinantes, utilizando o mesmo método de oxidação com metaperiodato de sódio. Apenas 5 mM de metaperiodato

de sódio já foi capaz de reduzir significativamente a interação da proteína Lsa23 com fibronectina plasmática, fibrinogênio, C4BP e fator H (Figura 34A). O mesmo foi observado para a interação da proteína Lsa36 e a fibronectina plasmática. Entretanto, o efeito oxidante na ligação do fibrinogênio com Lsa36, apesar de ser dose-dependente, só foi significativo com 10 mM de metaperiodato de sódio (Figura 34B). De acordo com os resultados obtidos, os resíduos de carboidratos da fibronectina plasmática, fibrinogênio, C4BP e fator H estão envolvidos nas ligações com as proteínas correspondentes.

Figura 34 – Participação dos carboidratos das glicoproteínas plasmáticas na interação com as proteínas Lsa23 (A) e Lsa36 (B)

Cada componente (250 ng) foi imobilizado em placa de ELISA e tratado com concentrações crescentes de metaperiodato de sódio (5-100 mM), por 1 hora, a temperatura ambiente, no escuro, antes de serem incubados com 500 ng de proteína recombinante. Cada ponto representa a porcentagem de ligação de cada proteína recombinante com as glicoproteínas correspondentes $\pm$ três desvios padrões, e são representativos de dois experimentos independentes. Para os cálculos estatísticos a ligação das proteínas recombinantes às glicoproteínas plasmáticas tratadas com metaperiodato de sódio foi comparada, pelo teste *t* bicaudal, com a sua ligação às glicoproteínas não tratadas (0 mM) (* $P < 0,05$).

Atualmente já é bem conhecido que a interação do PLG com seus receptores proteicos bacterianos frequentemente ocorre via seus domínios *kringle* e

resíduos de lisina da proteína (LAHTENMAKI; KUUSELA; KORHONEN, 2001). Nosso grupo demonstrou a participação desses domínios na interação do PLG com *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Fiocruz L1-130) pela primeira vez (VIEIRA et al., 2009). Por essa razão, a participação dos resíduos de lisina das proteínas recombinantes Lsa26, Lsa23 e Lsa36 na sua interação com o PLG foi avaliada utilizando ACA, um análogo de lisina, durante a incubação do componente com as proteínas. Apenas 2 mM de ACA inibiu fortemente a interação das três proteínas com o PLG (Figura 35), o que sugere uma participação importante dos resíduos proteicos de lisina na interação PLG-proteína.

Figura 35 – Avaliação do papel dos resíduos de lisina das proteínas recombinantes na interação com o plasminogênio

PLG (10 µg/mL) foi imobilizado em placa de microdiluição e em seguida incubado com 1 µg da proteína recombinante na presença (2 e 20 mM) ou ausência (0 mM) do análogo de lisina ACA. A detecção da ligação ao PLG foi realizada utilizando antissoro policlonal contra cada proteína. As barras representam a média das absorvâncias obtidas a 492 nm $\pm$ três desvios padrões, e são representativas de dois experimentos independentes. A interação das proteínas recombinantes com o PLG na presença do ACA foi comparada com sua interação na ausência do ACA pelo teste *t* bicaudal (* $P < 0,05$).

A fibronectina plasmática possui, na sua região N-terminal, uma porção com cerca de 70 kDa capaz de se ligar à gelatina, heparina, colágeno e fibrina. Ao digerir essa porção é possível obter dois fragmentos, um de 30 e outro de 45 kDa, que são responsáveis pela ligação da fibronectina plasmática à heparina e gelatina, respectivamente. Como as proteínas recombinantes Lsa23 e Lsa36 foram capazes de se ligar à fibronectina plasmática, com o objetivo de caracterizar melhor essa ligação, foram realizados ensaios de ligação com os fragmentos proteolíticos de 70, 45 e 30 kDa dessa glicoproteína.

Os ensaios de ligação foram realizados de maneira semelhante ao com a fibronectina plasmática inteira, em que 1 μg de proteína recombinante foi incubado com 1 μg do componente. Ambas as proteínas interagiram com o fragmento de 70 kDa da fibronectina plasmática, mais especificamente a região N-terminal de 30 kDa. Nenhuma interação foi observada entre as duas proteínas recombinantes e o fragmento proteolítico de 45 kDa (Figura 36A e B). A especificidade das interações foi avaliada de maneira quantitativa, e uma ligação dose-dependente e saturável entre a proteína Lsa36 e os fragmentos de 70 e 30 kDa foi observada com 0,25 e 0,40 μM de proteína, respectivamente (Figura 36D). O K_D foi calculado como descrito acima e pode ser visualizado no Quadro 8. A interação entre a proteína Lsa23 e os dois fragmentos foi dose dependente, porém a saturação não foi alcançada com até 3 μM da proteína recombinante (Figura 36C). Esses resultados corroboram com os resultados anteriores, em que a proteína Lsa36 possui maior afinidade com a fibronectina plasmática do que a Lsa23.

Figura 36 – Interação das proteínas Lsa23 e Lsa36 com o fragmento N-terminal da fibronectina plasmática

(A) e (B) Um micrograma de cada fragmento proteolítico (F70, F45, F30) foram adsorvidos em placas de microdiluição e incubados com 10 µg/mL de cada proteína recombinante. A interação foi detectada utilizando antissoro policlonal contra as proteínas recombinantes (A) ou anticorpo monoclonal antipolihistidina (B). Fetuína foi utilizada como controle para ligações inespecíficas, e sua interação com as proteínas recombinantes foi utilizada para realizar os cálculos estatísticos de teste *t* bicaudal (* $P < 0,005$). Cada ponto representa a média das absorvâncias obtidas a 492 nm $\pm$ três desvios padrões, e são representativas de dois experimentos independentes. (C) e (D) são curvas obtidas a partir da ligação dose dependente da Lsa23 (C) e da Lsa36 (D) com os fragmentos proteolíticos de 70 e 30 kDa. Cada ponto foi realizado em triplicata e expresso como a média dos valores de absorvância obtidos a 492 nm $\pm$ desvio padrão. Os K_D obtidos podem ser visualizados no Quadro 8.

Já que as proteínas recombinantes interagir com o fragmento responsável pela interação da fibronectina plasmática com a heparina (F30), foi avaliada a competição das proteínas com a heparina na ligação com esse fragmento. Para isso, 1 µM das proteínas recombinantes foi colocado junto com diferentes concentrações de heparina (0-350 IU) para interagir com o F30. O F70 foi utilizado como controle da reação. Os resultados obtidos demonstraram reduções significativas na interação da Lsa36 com os fragmentos de 70 e 30 kDa a partir de 35 e 70 IU de heparina, respectivamente (Figura 37B). Esse efeito foi semelhante ao

observado na interação da porção C-terminal da LipL32 com o F30 (HAUK et al., 2008). Nenhuma competição foi observada entre a Lsa23 e a heparina (Figura 37A), assim como observado para a proteína LenB (STEVENSON et al., 2007), sugerindo que essa proteína se ligue a outra região diferente do sítio de ligação da heparina na região N-terminal da fibronectina plasmática.

Figura 37 – Avaliação da competição entre a heparina sódica e as proteínas pela interação com os fragmentos de 70 e 30 kDa da fibronectina plasmática

(A) Lsa23. (B) Lsa36. Um micrograma da proteína recombinante foi incubado com concentração fixa de F70 e F30 na presença de concentrações crescentes de heparina sódica (0-350 IU). A interação das proteínas com os fragmentos proteolíticos na presença da heparina foi comparada com a interação das proteínas na ausência da heparina (0 IU) pelo teste *t* bicaudal (* $P < 0,05$). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Quadro 8 - Constante de dissociação (K_D) para a ligação das proteínas recombinantes com componentes do plasma humano

Componentes	Proteínas K_D	Lsa26 (nM)	Lsa23 (nM)	Lsa36 (nM)
Fibronectina Plasmática	-	-	528,7 ± 143,5	34,8 ± 10,4
F70	-	-	ND*	17,1 ± 4,0
F30	-	-	ND*	5,1 ± 1,2
Plasminogênio	6,4 ± 2,5	11,7 ± 1,4	-	17,8 ± 5,5
C4BP	-	17,6 ± 3,5	-	-
Fator H	-	ND*	-	-
Fibrinogênio	-	506,4 ± 0,29	205,7 ± 49	-

Notas: (-) não reativo. ND: não determinado.

3.10 Ativação do PLG ligado às proteínas recombinantes em plasmina

A plasmina é gerada a partir da quebra proteolítica do PLG. Tem sido demonstrado que vários patógenos se aproveitam das proteases do hospedeiro como estratégia para degradar componentes da MEC e penetrar nos tecidos, inclusive a *Borrelia* spp. (COLEMAN; BENACH, 1999; LAHTENMAKI; KUUSELA; KORHONEN, 2001). A conversão do PLG ligado à *L. interrogans* em plasmina, bem como a sua atividade proteolítica, foi descrita pela primeira vez pelo nosso grupo pesquisa (VIEIRA et al., 2009).

Para avaliar se o PLG ligado às proteínas Lsa26, Lsa23 e Lsa36 gera atividade proteolítica, como já demonstrado para outras proteínas recombinantes (DOMINGOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; VIEIRA et al., 2010), cada proteína foi adsorvida em uma placa de microdiluição e incubada com o PLG por 90 minutos. O PLG livre foi lavado e ativador uPA foi adicionado juntamente com substrato cromogênico específico para a plasmina. A reação foi desenvolvida por 16 horas e a atividade da plasmina foi mensurada indiretamente pela clivagem do substrato a 405 nm. Como pode ser visualizado na Figura 38, o PLG capturado pelas três proteínas recombinantes pode ser convertido em plasmina, demonstrando uma atividade proteolítica específica sobre o substrato cromogênico. Controles negativos empregando BSA ou faltando PLG, uPA ou o substrato cromogênico, não mostraram atividade enzimática. Esse resultado sugere que as três proteínas podem auxiliar a leptospira a se tornar um organismo proteolítico e assim conseguir atingir sítios secundários de infecção no hospedeiro.

Figura 38 – Conversão do plasminogênio ligado às proteínas recombinantes em plasmina

Proteínas recombinantes imobilizadas em placas de microdiluição foram incubadas com plasminogênio, seguida de incubação com uPA e substrato específico para plasmina (PLG+uPA+S). Controles faltando um dos três componentes (PLG+uPA; PLG+S; uPA+S) e BSA foram utilizados. As barras representam a média das absorbâncias obtidas a 405 nm, como uma dosagem relativa da degradação do substrato $\pm$ três desvios padrões para cada condição, e são representativas de dois experimentos independentes. Os cálculos estatísticos foram realizados pelo teste *t* bicaudal, em relação ao BSA ($P < 0,05$).

Abreviaturas: PLG - plasminogênio. uPA - ativador de plasminogênio tipo uroquinase. S - substrato cromogênico específico para plasmina.

3.11 Inibição da formação de fibrina pela Lsa36 ligada ao fibrinogênio

Nas etapas finais da cascata coagulação o fibrinogênio é convertido pela trombina em monômeros de fibrina, esses por sua vez irão se juntar ao tampão plaquetário para formar o coágulo de fibrina na tentativa de conter algum sangramento e reparar o tecido lesado.

Leptospiras são capazes de se ligarem ao fibrinogênio e essa ligação é altamente influenciada pela osmolaridade fisiológica (CHOY et al., 2007). A inibição da formação de fibrina por essas bactérias ligadas ao fibrinogênio foi demonstrada pela primeira vez pelo nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2013). Choy et al. (2011) demonstraram que a ligação da LigB ao fibrinogênio inibe parcialmente a formação da fibrina. Como as proteínas Lsa23 e Lsa36 se mostraram possíveis receptores para o fibrinogênio, foi investigado se essa interação, assim como na LigB, implicaria em alguma interferência na catalização do fibrinogênio em fibrina. Entretanto, só foi possível realizar o teste com a proteína Lsa36, pois a trombina só

possui atividade catalítica em pH inferior a 10 e a Lsa23 só se mantém solúvel em pH 12.

Para realização desse ensaio, a Lsa36 foi incubada com fibrinogênio em sua concentração de saturação (2 μ M). Em seguida, essa mistura foi incubada com 10 U/mL de trombina. A catalização do fibrinogênio foi avaliada a cada 1 minuto durante 10 minutos, e depois a cada 5 minutos por 35 minutos. A porcentagem da inibição foi calculada comparando a quantidade de fibrina formada em 45 minutos de reação (reação completa) na presença e ausência de proteína (100%). Como controle negativo, a trombina foi omitida da reação. Como apresentado na Figura 39, o efeito inibitório da Lsa36 sobre a catalização da fibrina foi similar ao observado para a proteína LigB, em contraste com o total impedimento da formação do coágulo pelas proteínas ligantes de fibrinogênio SdrG, de *S. epidermidis* (DAVIS et al., 2001), e a Clfa de *S. aureus* (LIU; SHIH; TSAI, 2005). Esses dados sugerem que um repertório redundante de proteínas receptoras do fibrinogênio deve atuar em conjunto na inibição da formação da fibrina. Além disso, a interação dessas proteínas com o fibrinogênio pode não ter como principal objetivo impedir a formação de um coágulo de fibrina.

Figura 39 – Inibição da formação de fibrina pela proteína Lsa36 ligada ao fibrinogênio

Fibrinogênio (1 mg/mL) foi incubado com 2 μ M de Lsa36 por 2 horas a 37 °C. Em seguida foram adicionados 10 U/mL de trombina e a catalização do fibrinogênio foi acompanhada por 45 minutos. **(A)** A formação de fibrina foi avaliada a cada 1 minuto por 10 minutos, e a cada 5 minutos por 35 minutos. Cada ponto foi realizado em triplicata e expresso como a média dos valores de absorvância obtidos a 595 nm $\pm$ o desvio padrão de cada ponto, e são representativos de dois experimentos independentes. **(B)** Porcentagem da inibição da formação da fibrina pela Lsa36 após 45 minutos de reação. A comparação entre as reações de catalização do fibrinogênio na presença e ausência da Lsa36 foi feita pelo teste *t* bicaudal ($P < 0,005$).

3.12 Retenção da atividade de cofator do fator H e do C4BP ligados à Lsa23

O fator H e o C4BP são reguladores negativos da via alternativa e clássica do sistema complemento, respectivamente. Fator H impede a ligação do fator B ao C3b e atua como cofator da enzima fator I durante a clivagem de C3b. O C4BP se liga ao C4b e também atua como cofator da enzima fator I durante a clivagem proteolítica do C4b. Dessa forma, ambos interrompem a cascata do sistema complemento impedindo a formação de C3 convertase.

Muitos patógenos aproveitam as atividades desses reguladores como mecanismo para resistir ao ataque do sistema complemento. A aquisição de

reguladores solúveis do sistema complemento já foi descrita para diversas bactérias, inclusive as espiroquetas *Borrelia* spp. (KRAICZY et al., 2002; WALLICH et al., 2005) e *T. denticola* (MCDOWELL et al., 2005). Essa habilidade também já foi demonstrada para as leptospiros. Adicionalmente, foi demonstrado que esses reguladores ligados à essa bactéria mantêm sua atividade de cofator (BARBOSA et al., 2009; MERI et al., 2005). Porém, até hoje, poucos receptores de leptospira foram descritos para esses componentes (BARBOSA et al., 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; DOMINGOS et al., 2012; SOUZA et al., 2012). Como a proteína Lsa23 foi capaz de se ligar tanto ao fator H quanto ao C4BP, foi avaliado se esses componentes competem entre si pela ligação com a proteína recombinante e se eles mantêm sua atividade de cofator quando ligados à ela.

Para o ensaio de competição, um micrograma da proteína Lsa23 foi imobilizado em placa de microdiluição e em seguida incubado com um micrograma de C4BP e concentrações crescentes do fator H (Figura 40A), ou com um micrograma de fator H e concentrações crescente do C4BP (Figura 40B). Os resultados mostraram que os dois componentes possuem sítios de ligação distintos na Lsa23, pois nenhum deles interferiu na interação do outro com a proteína (Figura 40).

Figura 40 – Ligação do fator H e C4BP em sítios diferentes da proteína Lsa23

Um micrograma de Lsa23 foi adsorvido em placa de microdiluição e incubado com 1 µg de C4BP e concentrações crescentes de fator H **(A)** ou 1 µg de fator H e concentrações crescentes de C4BP **(B)**. A detecção da interação dos componentes com a proteína foi realizada utilizando anti-C4BP **(A)** ou anti-fator H **(B)**. As barras representam as porcentagens de ligação $\pm$ três desvios padrões e são representativas de dois experimentos independentes. A interferência de um componente na ligação do outro foi avaliada em comparação com a interação da proteína com o componente em concentração fixa pelo teste *t* bicaudal.

Abreviaturas: FH – fator H.

Para avaliação da atividade de cofator do fator H e do C4BP ligados à Lsa23, dois microgramas da proteína foram imobilizados em placa de microdiluição e incubados com dois microgramas de um dos reguladores. A atividade de cofator foi avaliada por meio da visualização dos fragmentos resultantes da clivagem de C3b e C4b pela enzima fator I. A proteína Lsa36 foi utilizada como controle negativo para ligação. De acordo com os resultados obtidos (Figura 41), ambos reguladores retêm sua atividade de cofator quando ligados à Lsa23. Nenhuma clivagem do C3b e do C4b foi observada quando a proteína Lsa36 foi incubada com o fator H ou C4BP, demonstrando que a atividade proteolítica do fator I foi promovida pelos reguladores ligados à Lsa23.

Figura 41 – Atividade de cofator do fator H e do C4BP ligados à Lsa23

Dois microgramas da proteína Lsa23 ou Lsa36 imobilizados em placa de microdiluição foram incubados com 2 µg de fator H ou C4BP. Os componentes livres foram removidos e foram adicionados 500 ng de fator I e 1 µg de C3b ou C4b. Após 16 horas o sobrenadante foi coletado e separado por SDS-PAGE 10%. Os fragmentos resultantes da clivagem foram visualizados por imunoblotting (à esquerda) e por coloração com prata (à direita). Lsa36 foi utilizada como controle negativo para ligação com o fator H e C4BP. Reações omitindo o fator H e C4BP também foram utilizadas como controles negativos, e reações omitindo a proteína recombinante foram utilizadas como controles positivos (C+). (M) marcador molecular. * fragmentos resultantes da clivagem proteolítica.

3.13 Inibição da ligação das leptospiros aos componentes da MEC e do plasma pelas proteínas recombinantes

Vários estudos já demonstraram o efeito inibitório de diversas proteínas recombinantes na interação das leptospiros com componentes do plasma e da MEC (DOMINGOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; MENDES et al., 2011; PINNE; CHOY; HAAKE, 2010). Seguindo essa abordagem, foram realizados experimentos semelhantes com o intuito de avaliar se as proteínas recombinantes Lsa26, Lsa23 e Lsa36 possuem tal efeito na ligação das leptospiros à laminina, PLG, fibronectina plasmática, C4BP, fator H e fibrinogênio. Sendo assim, concentrações crescentes das proteínas recombinantes foram incubadas com os respectivos componentes e em seguida foi avaliada a interação da leptospiros com esses componentes. Os resultados obtidos para cada proteína recombinante e seus respectivos ligantes podem ser visualizados na Figura 42.

A adição de concentrações crescentes de Lsa26 reduziu significativamente a interação das leptospiros com a laminina e o PLG de maneira dose dependente, atingindo esse resultado com 2,5 e 7,5 µg de proteína, respectivamente. O mesmo efeito foi observado quando 2,5 µg de Lsa23 foi incubado com laminina, fibronectina plasmática, fibrinogênio e fator H. Para inibir a interação das leptospiros com o C4BP foram necessários 7,5 µg dessa proteína. Em contraste, somente 1,25 µg da mesma proteína foram necessários para inibir a interação das bactérias com o PLG. Em relação à Lsa36, foram necessários 1,25 µg da proteína para reduzir significativamente a interação das leptospiros com PLG e fibrinogênio, enquanto que para a fibronectina plasmática e laminina foram necessários 1,25 e 7,5 µg da proteína, respectivamente.

Os efeitos inibitórios sobre as leptospiros exercidos por todas as proteínas recombinantes para os seus respectivos ligantes sugerem que essas proteínas tenham participação na interação das bactérias com os componentes. Contudo, como já era esperado, a redução moderada, principalmente em relação a Lsa36, indica que o papel dessas proteínas seja redundante, e que outras proteínas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M-20) também contribuem para sua interação com a laminina, PLG, fibronectina plasmática, fibrinogênio, C4BP e fator H.

Figura 42 – Inibição da interação da *L. interrogans* com componentes da MEC e do plasma humano pelas proteínas recombinantes

Componentes da MEC e do plasma (1 µg/poço) foram imobilizados em placas de microdiluição e incubados com concentrações crescentes (0-10 µg) de **(A)** Lsa26, **(B)** Lsa23 ou **(C)** Lsa36 seguida de incubação com 10^7 *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M-20 vivas (100 µL/poço). As leptospiros que não se ligaram aos componentes foram lavadas, e as ligadas foram identificadas indiretamente utilizando antissoro anti-LipL32 produzido em camundongo (1:2000). As barras representam as porcentagens de ligação das leptospiros $\pm$ três desvios padrões. Os dados são representativos de dois experimentos independentes e a inibição significativa foi avaliada em comparação com a interação das leptospiros na ausência de proteína recombinante (0 µg) pelo teste *t* bicaudal (* $P < 0.05$).

3.14 Avaliação do efeito imunoprotetor das proteínas Lsa26 e Lsa23 em hamsters

Vacinas utilizadas atualmente contra leptospirose consistem em suspensões de bactérias mortas (bacterinas) e seu uso em humanos só está licenciado em alguns países como Japão, China e Cuba. Elas induzem imunidade humoral principalmente contra o LPS e por isso não promovem proteção cruzada nem duradoura, exigindo doses de reforço a cada 6 ou 12 meses. Além disso, as bacterinas ocasionam diversos efeitos colaterais como febre, vômitos e dor no local da aplicação, resultando em sua não aceitação por parte da população (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; FAINE et al., 1999). A falta de uma vacina eficiente e segura fez com que o foco das pesquisas sobre a leptospirose se voltasse para a busca de candidatos vacinais proteicos.

Devido a sua localização, OMPs associadas à superfície da leptospira são atraentes alvos vacinais. Elas são os primeiros componentes da bactéria a entrarem em contato com o sistema imunológico, mediando a relação patógeno-hospedeiro. Estão, também, amplamente envolvidas em processos de invasão e colonização do hospedeiro. Proteínas que sejam bem conservadas oferecem ainda a vantagem de promover uma resposta imune cruzada.

Seguindo esse princípio, vários grupos de pesquisa têm avaliado o papel imunoprotetor de proteínas localizadas na superfície da leptospira (CHANG et al., 2007; FELIX et al., 2011; YAN et al., 2010). Nosso grupo de pesquisa também tem seguido essa abordagem e vem demonstrando a atividade imunoprotetora de proteínas de membrana externa (ATZINGEN et al., 2010, 2012).

Considerando que as proteínas Lsa26 e Lsa23 estão provavelmente expostas na superfície da leptospira e possivelmente estão envolvidas em processos de colonização, invasão e evasão do hospedeiro, foi avaliado se elas são capazes de promover imunoproteção. Sendo assim, hamsters foram imunizados com duas doses da proteína recombinante e desafiados com dose letal de *L. interrogans* sorovar Kennewicki (LPF) virulentas. Hamsters foram utilizados nesse experimento por serem suscetíveis à leptospirose aguda e severa, apresentando um curso clínico da doença semelhante ao dos humanos, com quadro icterico e síndromes hemorrágicas graves (HAAKE, 2006; SILVA et al., 2008). Bacterinas compostas de *L. interrogans* sorovar Kennewicki (LPF) inativadas pelo calor foram utilizadas como

controle positivo para proteção e animais imunizados com PBS e *alúmen* foram utilizados como controles negativos.

Os ensaios de imunoproteção foram realizados em três experimentos independentes, dois com a proteína Lsa26 e um com a proteína Lsa23. Nos dois primeiros experimentos foram utilizados 12 animais por grupo e a dose letal de $2,5 \times 10^3$ *L. interrogans* sorovar Kennewicki (LPF). A curva de sobrevivência dos hamsters pode ser visualizada na Figura 43.

No primeiro experimento a proteína Lsa26 conferiu 16,5% de proteção aos animais desafiados com dose letal de leptospiros virulentas, enquanto que a bacterina conferiu 100% de proteção. No grupo PBS restou apenas um sobrevivente (8,5%) (Figura 43A). No segundo experimento a Lsa26 conferiu 25% de proteção aos animais imunizados, porém essa foi a mesma porcentagem de sobreviventes do grupo PBS. A bacterina novamente conferiu 100% de proteção. A análise da cinética de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meyer (KAPLAN; MEIER, 1958) determinou que a proteção conferida pela proteína Lsa26 não foi estatisticamente significativa em nenhum dos dois experimentos.

Figura 43 – Curva de sobrevivência de hamsters imunizados com Lsa26

Hamsters foram imunizados com 50 µg de Lsa26, em esquema de duas doses com intervalo de 15 dias. Quinze dias após a última imunização os animais foram inoculados intraperitonealmente com 2×10^3 *L. interrogans* sorovar Kennewicki (LPF) virulentas. Os animais foram acompanhados quanto à morbidade e mortalidade por um período de 21 dias. Animais imunizados com bacterina e PBS foram utilizados para controle de sobrevivência e morte, respectivamente.

Um grande fator limitante desses ensaios de desafio é a virulência da cepa infectante, que possui uma variabilidade muito alta. Mesmo com resultados reprodutivos entre os dois experimentos anteriores, resolvemos tentar controlar essa variante. Para isso, leptospiras foram avaliadas quanto à sua dose letal e, ao serem recuperadas dos animais infectados, foram congeladas a -80 °C para serem utilizadas em ensaios de desafios posteriores.

Portanto, no terceiro experimento, para avaliar a atividade imunoprotetora da Lsa23 foram utilizados grupos de 10 hamsters desafiados com 10^4 *L. interrogans* sorovar Kennewicki (LPF) virulentas. A curva de sobrevivência dos hamsters, apresentada na Figura 44, mostra que 30% dos animais imunizados com a Lsa23 sobreviveram ao desafio letal com leptospiras virulentas. Animais imunizados com

bacterina tiveram 100% de sobrevivência, enquanto que a sobrevivência dos animais do grupo PBS foi de 20%. Segundo a análise da cinética de sobrevivência por Kaplan-Meyer (KAPLAN; MEIER, 1958) a proteção conferida não foi estatisticamente significativa. Infelizmente não foi possível repetir o experimento para confirmar esse resultado e avaliar a eficácia da utilização de leptospiros congeladas.

Figura 44 – Curva de sobrevivência dos hamsters imunizados com Lsa23

Hamsters foram imunizados com 50 µg de Lsa23, em esquema de duas doses com intervalo de 15 dias. Quinze dias após a última imunização os animais foram inoculados intraperitonealmente com 10^4 *L. interrogans* sorovar Kennewicki (LPF) virulentas. Os animais foram acompanhados quanto à morbidade e mortalidade por um período de 21 dias. Animais imunizados com bacterina e PBS foram utilizados para controle de sobrevivência e morte, respectivamente.

Para avaliar a indução de resposta humoral pelas proteínas Lsa23 e Lsa26, amostras de soros foram coletadas 15 dias após cada imunização e também dos animais sobreviventes. A média dos títulos dos soros em cada sangria pode ser observado no Quadro 9. Apesar de não ser observado aumento nas médias dos títulos após a segunda sangria, vale a pena ressaltar que alguns animais, isoladamente, apresentaram aumento nesses títulos. A diminuição nos títulos dos soros dos animais sobreviventes imunizados com a Lsa26 e o reconhecimento imune da proteína pelos soros dos animais do grupo PBS após o desafio sugerem que a resposta humoral pode não estar envolvida nos mecanismos de imunoproteção. De fato, já foi demonstrado que vacinas induzem uma forte resposta imune do tipo Th1 em bovinos, com secreção de IFN- γ por células T $\gamma\delta$ e CD4+ (NAIMAN et al., 2001; ZUERNER et al., 2011). Além do mais, em humanos, estudos demonstraram que leptospiros ativam mais células T $\gamma\delta$ do que $\alpha\beta$ (KLIMPEL; MATTHIAS; VINETZ, 2003; TUERO; VINETZ; KLIMPEL, 2010).

Quadro 9 – Média dos títulos dos antissoros de hamsters imunizados com Lsa26 e Lsa23

Experimento	Sangria	Lsa26	Lsa23	PBS
Nº 1	1^a	3200	-	NR
	2^a	3200	-	NR
	Sobreviventes	400	-	800
Nº 2	1^a	3200	-	NR
	2^a	2200	-	NR
	Sobreviventes	600	-	800
Nº 3	1^a	-	70	NR
	2^a	-	2400	NR
	Sobreviventes	-	800	NR

Abreviaturas: NR – não reativo. (-) não realizado.

Vinte e um dias após o desafio, os animais que sobreviveram foram sacrificados e tiveram seus rins extraídos para o isolamento das leptospiros em meio de cultura. Bactérias foram recuperadas de todos os animais sobreviventes que foram imunizados com as proteínas Lsa26 e Lsa23, em contraste com os animais imunizados com a bacterina, que como esperado, exerceu efeito esterilizante.

Os ensaios de desafio para avaliar a imunoproteção de candidatos vacinais para leptospirose ainda possui vários fatores limitantes. A sobrevivência de animais não vacinados tem sido relatada por vários grupos de pesquisa (BRANGER et al., 2001; PALANIAPPAN et al., 2006). Palaniappan et al. (2006) relataram a sobrevivência de 80% dos animais do grupo não imunizado em seu experimento.

Além da dificuldade em controlar a virulência bacteriana, como mencionado acima, a falta da disponibilidade de hamsters isogênicos criados em ambientes controlados também é um problema. Outra variante é a via de inoculação; a inoculação intraperitoneal, apesar de permitir que a dose de leptospiros seja controlada, não reflete a via de infecção natural dessas bactérias. Outras vias de inoculação que mimetizam a rota de infecção natural, como mucosa oral e membrana ocular, vêm sendo testadas e resultados interessantes têm sido obtidos (BOLIN; ALT, 2001; LOURDAULT et al., 2014).

Portanto, apesar dos resultados obtidos sugerirem que as proteínas Lsa26 e Lsa23 não são boas candidatas vacinais, estudos mais controlados explorando a utilização de outros adjuvantes e até mesmo a combinação de antígenos proteicos poderiam apresentar resultados mais promissores.

4 CONCLUSÃO

Os genes LIC11009, LIC11360 e LIC11975 foram selecionados para estudo pelo fato de suas proteínas correspondentes serem preditas de membrana externa. Ensaio de IF e digestão com PK confirmaram essa predição. Adicionalmente, resultados de expressão gênica mostraram que esses genes estão distribuídos e são transcritos principalmente em cepas patogênicas de leptospira, e não são transcritos na espécie saprofítica *biflexa*. A reatividade com soro de humanos e hamsters infectados mostrou que as proteínas provavelmente são expressas pelas leptospiros durante a infecção. Além disso, as proteínas recombinantes Lsa26, Lsa23 e Lsa36 se mostraram capazes de interagir com a laminina. As duas últimas também foram capazes de se ligarem à fibronectina plasmática. Esses resultados indicam que essas proteínas provavelmente estão envolvidas nos processos de invasão e colonização do hospedeiro pela leptospira.

As três proteínas também são capazes de interagir com o PLG e podem auxiliar a leptospira a se tornar um organismo proteolítico e assim conseguir evadir o sistema imunológico e atingir sítios secundários de colonização.

As proteínas Lsa23 e Lsa36 também foram capazes de interagir com o fibrinogênio. Essa última ainda foi capaz de inibir parcialmente a formação da fibrina. A inibição da formação de coágulos e trombos pode auxiliar a leptospira a se disseminar pela corrente sanguínea. Esse evento pode explicar, em parte, os quadros hemorrágicos presentes na leptospirose. A interação dessas proteínas com o fibrinogênio também pode ser outra estratégia de colonização.

A proteína Lsa23 parece ter um papel multifuncional, estando envolvida em todas as etapas da infecção bacteriana. A capacidade de ela interagir com os reguladores do sistema complemento fator H e C4BP pode auxiliar a leptospira na evasão do sistema complemento, pois ambos mantêm sua atividade de cofator quando ligados à ela.

Os resultados obtidos por esse trabalho demonstram a habilidade das proteínas recombinantes *in vitro*. Estudos mais detalhados são necessários para que o papel de cada proteína seja evidenciado na prática. Entretanto, os efeitos inibitórios exercidos pelas proteínas recombinantes na interação das leptospiros com a laminina, PLG, fibronectina plasmática, fibrinogênio, C4BP e fator H reforçam a

hipótese de que essas proteínas atuam como receptores proteicos na superfície da leptospira.

Sendo assim, os resultados desse estudo indicam fortemente que as proteínas Lsa26, Lsa23 e Lsa36 estão expostas na superfície da leptospira durante a infecção auxiliando a bactéria a evadir, invadir e colonizar o hospedeiro.

REFERÊNCIAS*

- ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- ADLER, B. et al. Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. **Vet. Microbiol.**, v. 153, n. 1-2, p. 73-81, 2011.
- AGAMPODI, S. B. et al. Outbreak of leptospirosis after white-water rafting: sign of a shift from rural to recreational leptospirosis in Sri Lanka?. **Epidemiol. Infect.**, v. 142, n. 4, p. 843-846, 2014.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- _____. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- AMSEN, D.; SPILIANAKIS, C. G.; FLAVELL, R. A. How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, n. 2, p. 153-160, 2009.
- ANGLES-CANO, E.; ROUY, D.; LIJNEN, H. R. Plasminogen binding by alpha 2-antiplasmin and histidine-rich glycoprotein does not inhibit plasminogen activation at the surface of fibrin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1156, n. 1, p. 34-42, 1992.
- ATZINGEN, M. V. et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol.**, v. 8, p. 70, 2008.
- _____. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. **J. Infect.**, v. 59, n. 4, p. 264-276, 2009.
- _____. Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with *Leptospira interrogans*. **J. Med. Microbiol.**, v. 59, pt. 9, p. 1005-1015, 2010.
- _____. Evaluation of immunoprotective activity of six leptospiral proteins in the hamster model of leptospirosis. **Open Microbiol. J.**, v. 6, p. 79-87, 2012.
- BAL, A. E. et al. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 8, p. 1894-1898, 1994.
- BAMFORD, C. V. et al. The chymotrypsin-like protease complex of *Treponema denticola* ATCC 35405 mediates fibrinogen adherence and degradation. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 9, p. 4364-4372, 2007.

* De acordo com:

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

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 10, n. 5, p. 411-421, 1999.

BARBOSA, A. S. et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 11, p. 6356-6364, 2006.

_____. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 3, p. 1137-1143, 2009.

_____. 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. 3207-3216, 2010.

BENDTSEN, J. D. et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **J. Mol. Biol.**, v. 340, n. 4, p. 783-795, 2004.

BERGGARD, K. et al. *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 9, p. 3638-3643, 1997.

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

BLOM, A. M. Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 30, pt. 6, p. 978-982, 2002.

BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **Am. J. Vet. Res.**, v. 62, n. 7, p. 995-1000, 2001.

BOURHY, P. et al. Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a mariner transposon. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 9, p. 3255-3258, 2005.

BRANGER, C. et al. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 7, p. 4062-4069, 2005.

_____. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 11, p. 6831-6838, 2001.

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. 4448-4458, 2003.

BROWNLOW, T. et al. 'Leptorapide' - a one-step assay for rapid diagnosis of human leptospirosis. **Epidemiol. Infect.**, p. 1-6, 2013.

BRYKSIN, A. V. et al. BmpA is a surface-exposed outer-membrane protein of *Borrelia burgdorferi*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 309, n. 1, p. 77-83, 2010.

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. 14560-14565, 2006.

CAMERON, C. E. Identification of a *Treponema pallidum* laminin-binding protein. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 5, p. 2525-2533, 2003.

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. 7379-7386, 2011.

CARRILLO-CASAS, E. M. et al. Selection of the internal control gene for real-time quantitative rt-PCR assays in temperature treated *Leptospira*. **Curr. Microbiol.**, v. 56, n. 6, p. 539-546, 2008.

CARVALHO, E. et al. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. **FEBS Lett.**, v. 583, n. 8, p. 1381-1385, 2009.

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, 2012.

CELLO: subcellular localization predictor. Version 2.5. Molecular bioinformatics center: 2006. Disponível em: < <http://cello.life.nctu.edu.tw/>>.

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infect. Genet. Evol.**, v. 9, n. 5, p. 760-768, 2009.

CHAGNOT, C. et al. Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components. **Cell. Microbiol.**, v. 14; n. 11, p. 1687-1696, 2012.

CHANG, Y. F. et al. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. **Vaccine**, v. 25, n. 48, p. 8190-8197, 2007.

CHIERAKUL, W. et al. Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 2, p. 254-260, 2008.

CHOU, L. F. et al. Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. **Gene**, v. 511, n. 2, p. 364-370, 2012.

CHOW, E. et al. Prolonged *Leptospira* urinary shedding in a 10-year-old girl. **Case Rep. Pediatr.**, v. 2012, n. 16903, p. 1-3, 2012.

CHOY, H. A. Multiple activities of LigB potentiate virulence of *Leptospira interrogans*: inhibition of alternative and classical pathways of complement. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41566, 2012.

CHOY, H. A. et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 5, p. 2441-2450, 2007.

_____. The multifunctional LigB adhesin binds homeostatic proteins with potential roles in cutaneous infection by pathogenic *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16879, 2011.

CHROMAS lite. Version 2.1. Technelysim, 2005. Software. Disponível em: <<http://chromas-lite.software.informer.com/2.1/>>. Acesso em: 10 nov. 2010.

CINCO, M. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. **New Microbiol.**, v. 33, n. 4, p. 283-292, 2010.

CINCO, M. et al. *Leptospira interrogans* binds to the CR3 receptor on mammalian cells. **Microb. Pathog.**, v. 33, n. 6, p. 299-305, 2002.

CLUSTALW2. The European bioinformatics institute, 2013. Server. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>>. Acesso em: 5 fev. 2012.

COLEMAN, J. L.; BENACH, J. L. Use of the plasminogen activation system by microorganisms. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 134, n. 6, p. 567-576, 1999.

COSTA, F. et al. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul virus, and *Bartonella* spp. among Norway rats (*Rattus norvegicus*) from the urban slum environment in Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 14, n. 1, p. 33-40, 2014.

COUTINHO, M. L. et al. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 12, p. e1422, 2011.

COX, D. L. et al. Surface immunolabeling and consensus computational framework to identify candidate rare outer membrane proteins of *Treponema pallidum*. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 12, p. 5178-5194, 2010.

CRODA, J. et al. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 12, p. 5826-5833, 2008.

_____. Leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 16, n. 6, p. 593-599, 2010.

_____. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 5, p. 1528-1534, 2007.

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

DAHER, E. F. et al. Factors associated with thrombocytopenia in severe leptospirosis (Weil's disease). **Clinics (Sao Paulo)**, v. 69, n. 2, p. 106-110, 2014.

DAVIS, J. M.; HAAKE, D. A.; RAMAKRISHNAN, L. *Leptospira interrogans* stably infects zebrafish embryos, altering phagocyte behavior and homing to specific tissues. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, n. 6, p. e463, 2009.

DAVIS, S. L. et al. SdrG, a fibrinogen-binding bacterial adhesin of the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules subfamily from *Staphylococcus epidermidis*, targets the thrombin cleavage site in the B β chain. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 30, p. 27799-27805, 2001.

DELANY, I.; RAPPUOLI, R.; SEIB, K. L. Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 3, n. 5, p. a012476, 2013.

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Hum. Vaccin.**, v. 7, n. 11, p. 1215-1224, 2011.

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, 2012.

DUTTON, R. W. Inhibitory and stimulatory effects of concanavalin A on the response of mouse spleen cell suspensions to antigen. I. Characterization of the inhibitory cell activity. **J. Exp. Med.**, v. 136, n. 6, p. 1445-1460, 1972.

DWYER, J. M.; JOHNSON, C. The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 46, n. 2, p. 237-249, 1981.

EBELING, W. et al. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. **Eur. J. Biochem.**, v. 47, n. 1, p. 91-97, 1974.

EDWARDS, A. M. et al. Binding properties and adhesion-mediating regions of the major sheath protein of *Treponema denticola* ATCC 35405. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 5, p. 2891-2898, 2005.

ESHGHI, A. et al. *Leptospira interrogans* catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence. **Infect. Immun.**, v. 80, n. 11, p. 3892-3899, 2012.

EVANGELISTA, K. et al. *Leptospira interrogans* Binds to Cadherins. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 1, p. e2672, 2014.

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. 1413-1425, 2010.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 2nd ed. Melbourne, Australia: 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. 277-287, 2008.

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

FERNANDES, L. G. et al. Functional and immunological evaluation of two novel proteins of *Leptospira* spp. **Microbiology**, v. 160, pt. 1, p. 149-164, 2014.

_____. OmpL1 Is an Extracellular Matrix- and Plasminogen-Interacting Protein of *Leptospira* spp. **Infect. Immun.**, v. 80, n. 10, p. 3679-3692, 2012.

FINN, R. D. et al. Pfam: clans, web tools and services. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, n. Database issue, p. D247-251, 2006.

FLANNERY, B. et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 9, p. 3303-3310, 2001.

FLICK, M. J. et al. Genetic elimination of the binding motif on fibrinogen for the *S. aureus* virulence factor ClfA improves host survival in septicemia. **Blood**, v. 121, n. 10, p. 1783-1794, 2013.

FRAGA, T. R.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scand J. Immunol.**, v. 73, n. 5, p. 408-419, 2011.

FRAGA, T. R. et al. Immune evasion by pathogenic leptospira strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. **J. Infect. Dis.**, v. 209, n. 6, p. 876-886, 2013.

FUCHS, H. et al. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 91, n. 26, p. 12594-12598, 1994.

GANOZA, C. A. et al. Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by *Leptospira*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 2, p. e612, 2010.

GASTEIGER, J. Chemoinformatics: a new field with a long tradition. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 384, n. 1, p. 57-64, 2006.

GAUDIE, C. M. et al. Human *Leptospira interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae infection (Weil's disease) acquired from pet rats. **Vet. Rec.**, v. 163, n. 20, p. 599-601, 2008.

GELQUANT. AMPL software, 2003. Software.

GENERUNNER®. Version 3.01. Hasting software, Inc., 1994. Software. Disponível em: < <http://www.generunner.net/>>. Acesso em: 10 ago. 2010.

GIGLI, I.; FUJITA, T.; NUSSENZWEIG, V. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 76, n. 12, p. 6596-6600, 1979.

GLICK, B. R. et al. **Molecular biotechnology**: principles and applications of recombinant DNA. Washington, USA: ASM Press, 2010.

GOMEZ, R. M. et al. Putative outer membrane proteins of *Leptospira interrogans* stimulate human umbilical vein endothelial cells (HUVECS) and express during infection. **Microb. Pathog.**, v. 45, n. 5-6, p. 315-322, 2008.

GONCALVES, D. D. et al. Zoonoses in humans from small rural properties in Jataizinho, Parana, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 44, n. 1, p. 125-131, 2013.

GRASSMANN, A. A. et al. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 19, n. 5, p. 740-745, 2012.

GRATZNER, H. G. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. **Science**, v. 218, n. 4571, p. 474-475, 1982.

GUERRA, M. A. Leptospirosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 234, n. 4, p. 472-478, 2009.

GUERREIRO, H. et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 8, p. 4958-4968, 2001.

GUERRIER, G.; D'ORTENZIO, E. The Jarisch-Herxheimer reaction in leptospirosis: a systematic review. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59266, 2013.

GULATI, S.; GULATI, A. Pulmonary manifestations of leptospirosis. **Lung India**, v. 29, n. 4, p. 347-353, 2012.

HAAKE, D. A. Hamster model of leptospirosis. **Curr. Protoc. Microbiol.**, v. Chapter 12, p. Unit 12E 2, 2006.

HAAKE, D. A. et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Mol. Microbiol.**, 2010.

HAAKE, D. A. et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 12, p. 6572-6582, 1999.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, n. 4, p. 494-501, 2011.

HARTWIG, D. D. et al. Mannosylated LigANI produced in *Pichia pastoris* protects hamsters against leptospirosis. **Curr. Microbiol.**, v. 68, n. 4, p. 524-530, 2014.

_____. A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 20, n. 5, p. 747-752, 2013.

HAUK, P. et al. Calcium binding to leptospira outer membrane antigen LipL32 is not necessary for its interaction with plasma fibronectin, collagen type IV, and plasminogen. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 7, p. 4826-4834, 2012.

_____. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 6, p. 2642-2650, 2008.

HE, Y. Analyses of *Brucella* pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics. **Front Cell Infect. Microbiol.**, v. 2, p. 2, 2012.

HOKE, D. E. et al. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 5, p. 2063-2069, 2008.

HOUSTON, S. et al. Bifunctional role of the *Treponema pallidum* extracellular matrix binding adhesin Tp0751. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 3, p. 1386-1398, 2011.

HU, L. T. et al. Binding of human plasminogen to *Borrelia burgdorferi*. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 9, p. 3491-3496, 1995.

ISOGAI, E. et al. Biological activities of leptospiral lipopolysaccharide. **Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. A.**, v. 261, n. 1, p. 53-64, 1986.

JOHNSON, R. C.; MUSCHEL, L. H. Antileptospiral activity of normal serum. **J. Bacteriol.**, v. 89, p. 1625-1626, 1965.

JUNCKER, A. S. et al. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. **Protein. Sci.**, v. 12, n. 8, p. 1652-1662, 2003.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J. Am. Statist. Assoc.**, v. 53, p. 457-481, 1958.

KASSENE, K. et al. Identification of collagenase as a critical virulence factor for invasiveness and transmission of pathogenic leptospira species. **J. Infect. Dis.**, v. 209, n. 7, p. 1105-1115, 2013.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

KING, A. M. et al. High-temperature protein G is an essential virulence factor of *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v. 82, n. 3, p. 1123-1131, 2014.

KLEMPNER, M. S. et al. Binding of human plasminogen and urokinase-type plasminogen activator to the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. **J. Infect. Dis.**, v. 171, n. 5, p. 1258-1265, 1995.

KLIMPEL, G. R.; MATTHIAS, M. A.; VINETZ, J. M. *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells: preferential expansion of TCR gamma delta+ T cells vs TCR alpha beta+ T cells. **J. Immunol.**, v. 171, n. 3, p. 1447-1455, 2003.

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. 736-747, 2009.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 226, n. 2, p. 215-219, 2003.

_____. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, n. 11-12, p. 1545-1552, 2004.

_____. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. **J. Postgrad. Med.**, v. 51, n. 3, p. 210-214, 2005.

KRAICZY, P. et al. Complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*: a new protein family involved in complement resistance. **Wien. Klin. Wochenschr.**, v. 114, n. 13-14, p. 568-573, 2002.

LAHTENMAKI, K.; KUUSELA, P.; KORHONEN, T. K. Bacterial plasminogen activators and receptors. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 25, n. 5, p. 531-552, 2001.

LAMBERT, A. et al. FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. **Infect. Immun.**, v. 80, n. 6, p. 2019-2025, 2012.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LETUNIC, I. et al. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, n. Database issue, p. D257-260, 2006.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, n. Database issue, p. D302-305, 2012.

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

LI, S. et al. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. **Innate. Immun.**, v. 16, n. 2, p. 80-92, 2010.

LIAO, S. et al. Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. **BMC Microbiol.**, v. 9, p. 253, 2009.

LIM, V. K. Leptospirosis: a re-emerging infection. **Malays J. Pathol.**, v. 33, n. 1, p. 1-5, 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. 19380-19391, 2009.

_____. *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen alphaC domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. **Mol. Microbiol.**, v. 79, n. 4, p. 1063-1076, 2011.

LINDAHL, G.; SJOBRING, U.; JOHNSON, E. Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, n. 1, p. 44-51, 2000.

LIPOP. Version 1.0. Center for biological sequence analysis, 2011. Server. Disponível em: < <http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>>.

LIU, Y. et al. Pathogenesis of leptospirosis: interaction of *Leptospira interrogans* with *in vitro* cultured mammalian cells. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 196, n. 4, p. 223-239, 2007.

LIU, C. Z.; SHIH, M. H.; TSAI, P. J. ClfA(221-550), a fibrinogen-binding segment of *Staphylococcus aureus* clumping factor A, disrupts fibrinogen function. **Thromb. Haemost.**, v. 94, n. 2, p. 286-294, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LJUNGH, A.; WADSTROM, T. Interactions of bacterial adhesins with the extracellular matrix. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 408, p. 129-140, 1996.

LO, M. et al. Comparative transcriptional and translational analysis of leptospiral outer membrane protein expression in response to temperature. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, n. 12, p. e560, 2009.

LONGHI, M. T. et al. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, n. Pt 10, p. 1275-1282, 2009.

LOUIS-JEUNE, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; PEREZ-IRATXETA, C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. **Proteins**, 2012.

LOURDAULT, K. et al. Inactivation of clpB in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 9, p. 3711-3717, 2011.

_____. Oral immunization with *Escherichia coli* expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Infect. Immun.**, v. 82, n. 2, p. 893-902, 2014.

LUCAS, D. S. et al. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. **Vaccine**, v. 29, n. 18, p. 3413-3418, 2011.

LUO, Y. et al. InvA protein is a Nudix hydrolase required for infection by pathogenic *Leptospira* in cell lines and animals. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 42, p. 36852-36863, 2011.

LUPI, O. et al. Cluster of leptospirosis cases among military personnel in Rio de Janeiro, Brazil. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 17, n. 2, p. e129-131, 2013.

MALMSTROM, J. et al. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 762-765, 2009.

MALOY, S. R. **Experimental techniques in bacterial genetics**. Boston: Jones e Barlett Pub, 1989.

MARANGONI, A. et al. Production of tumor necrosis factor alpha by *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi* s.l., and *Leptospira interrogans* in isolated rat Kupffer cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 40, n. 3, p. 187-191, 2004.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. Database issue, p. D205-10, 2009.

MARTINS, C. M. et al. Incidence of canine leptospirosis in the metropolitan area of Curitiba, State of Parana, Southern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, n. 6, p. 772-775, 2013.

MATSUI, M. et al. Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 11, p. 4480-4492, 2011.

MATSUNAGA, J. et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol. Microbiol.**, v. 49, n. 4, p. 929-945, 2003.

_____. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 6, p. 2864-2874, 2007.

MATTHIAS, M. A. et al. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 4, p. e213, 2008.

MCBRIDE, A. J. et al. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 18, n. 5, p. 376-386, 2005.

MCDOWELL, J. V. et al. Demonstration of factor H-like protein 1 binding to *Treponema denticola*, a pathogen associated with periodontal disease in humans. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 11, p. 7126-7132, 2005.

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. 4657-4667, 2011.

MERI, T. et al. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospire. **Microb. Pathog.**, v. 39, n. 4, p. 139-147, 2005.

MERIEN, F. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira* interrogans are correlated with virulence. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 2, p. 729-738, 1997.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, 2009. 32 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de informação de agravos de notificação**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portal/%20arquivos/pdf/tab_casos_conf_ser_hist_1997_2012.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2012.

MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **J. Mol. Biol.**, v. 260, n. 3, p. 289-298, 1996.

MOOTOO, A. et al. TNF-alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality. **Inflamm. Allergy Drug Targets**, v. 8, n. 1, p. 53-62, 2009.

MURRAY, G. L. et al. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 2, p. 810-816, 2009a.

_____. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 78, n. 3, p. 701-709, 2010.

_____. *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. **Microbes Infect.**, v. 11, n. 2, p. 311-4, 2009b.

_____. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 3, p. 952-958, 2009c.

MUSSO, D.; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 46, n. 4, p. 245-252, 2013.

NABITY, S. A. et al. Accuracy of a dual path platform (DPP) assay for the rapid point-of-care diagnosis of human leptospirosis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 11, p. e1878, 2012.

NAIMAN, B. M. et al. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 12, p. 7550-7558, 2001.

NAKAI, K.; HORTON, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. **Trends. Biochem. Sci.**, v. 24, n. 1, p. 34-36, 1999.

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

NALLY, J. E. et al. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. **Am. J. Pathol.**, v. 164, n. 3, p. 1115-1127, 2004.

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. 2164-2172, 2004a.

_____. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 4, p. 459-477, 2004b.

NIELSEN, H. et al. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Int. J. Neural Syst.**, v. 8, n. 5-6, p. 581-599, 1997.

NOGUEIRA, S. V. et al. *Leptospira interrogans* enolase is secreted extracellularly and interacts with plasminogen. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e78150, 2013.

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.

_____. 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. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 3, p. 207-217, 2010.

PALANIAPPAN, R. U. et al. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 3, p. 1745-1750, 2006.

PANCHOLI, V.; FISCHETTI, V. A. alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 23, p. 14503-14515, 1998.

PFAM. Version 27.0. Sanger institute, 2013. Server. Disponível em: <<http://pfam.sanger.ac.uk/>>. Acesso em: 5 ago. 2010.

LEPTOSPIRA – Genome Project. 2001. Disponível em: <<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>>. Acesso em: 4 ago. 2010.

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

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, 2014.

PICARDEAU, M.; BRENOT, A.; SAINT GIRON, I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. **Mol. Microbiol.**, v. 40, n. 1, p. 189-199, 2001.

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, 2008a.

_____. 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, 2008b.

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

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, 2009.

PIZZA, M. et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1816-1820, 2000.

PONTING, C. P.; MARSHALL, J. M.; CEDERHOLM-WILLIAMS, S. A. Plasminogen: a structural review. **Blood Coagul. Fibrinolysis**, v. 3, n. 5, p. 605-614, 1992.

PRETRE, G. et al. Characterization of LIC11207, a novel leptospiral protein that is recognized by human convalescent sera and prevents apoptosis of polymorphonuclear leukocytes. **Microb. Pathog.**, v. 56, p. 21-28, 2013.

PROMEGA technical manual: pGEM-T and pGEM-T Easy vector systems. USA: 2010.

PROTPARAM. Swiss institute of bioinformatics, 2005. Server. Disponível em: <<http://web.expasy.org/protparam/>>. Acesso em: 15 jan. 2011.

PSORT prediction. 1999. Disponível em: <<http://psort.hgc.jp/form.html>>. Acesso em: 5 ago. 2010.

PUNTA, M. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, n. Database issue, p. D290-301, 2012.

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. 25420-25429, 2004.

RADL, C. et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Langau, Austria, 2010. **Wien. Klin. Wochenschr.**, v. 123, n. 23-24, p. 751-755, 2011.

RAM, S. et al. Binding of C4b-binding protein to porin: a molecular mechanism of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Exp. Med.**, v. 193, n. 3, p. 281-295, 2001.

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. 1103-1109, 2004.

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 74, n. 2, p. 101-120, 2009.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, n. 5, p. 445-450, 2000.

REED, S. G. et al. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends Immunol.**, v. 30, n. 1, p. 23-32, 2009.

REN, S. X. et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 888-893, 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.

RISTOW, P. et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathog.**, v. 3, n. 7, p. e97, 2007.

_____. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, pt. 5, p. 1309-1317, 2008.

RIVERA, J. et al. Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. **Thromb. Haemost.**, v. 98, n. 3, p. 503-511, 2007.

SABAT, R. et al. Biology of interleukin-10. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 21, n. 5, p. 331-344, 2010.

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. 5463-5467, 1977.

SCHULTZ, J. et al. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 95, n. 11, p. 5857-5864, 1998.

SEIB, K. L.; ZHAO, X.; RAPPUOLI, R. Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 18 Suppl 5, p. 109-116, 2012.

SEIXAS, F. K. et al. Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the LipL32 antigen of Leptospira interrogans protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v. 26, n. 1, p. 88-95, 2007.

SIGNALP. Version 4.1. Center for biological sequence analysis, 2013. Server. Disponível em: < <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>>. Acesso em: 5 ago. 2010.

SILVA, E. F. et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6277-6286, 2007.

_____. Characterization of virulence of Leptospira isolates in a hamster model. **Vaccine**, v. 26, n. 31, p. 3892-3896, 2008.

SIQUEIRA, G. H. et al. Characterization of three novel adhesins of Leptospira interrogans. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, n. 6, p. 1103-1116, 2013.

SMART. 2012. Server. Disponível em: <http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1>. Acesso em: 5 ago. 2010.

SONNHAMMER, E. L.; EDDY, S. R.; DURBIN, R. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. **Proteins**, v. 28, n. 3, p. 405-420, 1997.

SORENSEN, H. P. et al. Soluble expression of aggregating proteins by covalent coupling to the ribosome. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 319, n. 3, p. 715-719, 2004.

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. 125-134, 2012.

STAMM, L. V. et al. Heat shock response of spirochetes. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 4, p. 1572-1575, 1991.

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

STUDIER, F. W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. **J. Mol. Biol.**, v. 219, n. 1, p. 37-44, 1991.

STURZENBAUM, S. R.; KILLE, P. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v. 130, n. 3, p. 281-289, 2001.

TETTELIN, H. et al. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1809-1815, 2000.

THERN, A. et al. Ig-binding surface proteins of *Streptococcus pyogenes* also bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system. **J. Immunol.**, v. 154, n. 1, p. 375-386, 1995.

THOMAS, D. D.; HIGBIE, L. M. *In vitro* association of leptospires with host cells. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 3, p. 581-585, 1990.

TRUEBA, G. et al. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **Int. Microbiol.**, v. 7, n. 1, p. 35-40, 2004.

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. 420-427, 2010.

TURNER, L. H. Leptospirosis. 3. Maintenance, isolation and demonstration of leptospires. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 64, n. 4, p. 623-646, 1970.

ULLMANN, L. S. et al. Serologic survey for *Leptospira* spp. in captive neotropical felids in Foz do Iguacu, Parana, Brazil. **J. Zoo. Wildl. Med.**, v. 43, n. 2, p. 223-228, 2012.

VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, v. 44, n. 5, p. 619-626, 2008.

VERMA, A. et al. Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 5, p. 2053-2059, 2010.

_____. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 5, p. 2659-2666, 2006.

VERMA, A. K. et al. Leptospirosis-persistence of a dilemma: an overview with particular emphasis on trends and recent advances in vaccines and vaccination strategies. **Pak. J. Biol. Sci.**, v. 15, n. 20, p. 954-963, 2012.

VERNEL-PAUILLAC, F.; MERIEN, F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 7, p. 4172-4179, 2006.

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. 1764-1774, 2013.

_____. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11259, 2010.

_____. A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 276, n. 2, p. 172-180, 2007.

_____. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. **Microb. Pathog.**, v. 51, n. 5, p. 360-365, 2011.

_____. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 352, n. 2, p. 129-139, 2014.

_____. Plasminogen acquisition and activation at the surface of leptospira species lead to fibronectin degradation. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 9, p. 4092-4101, 2009.

VINH, T.; ADLER, B.; FAINE, S. Glycolipoprotein cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. **J. Gen. Microbiol.**, v. 132, n. 1, p. 111-123, 1986.

WALLICH, R. et al. Identification and functional characterization of complement regulator-acquiring surface protein 1 of the Lyme disease spirochetes *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 4, p. 2351-9, 2005.

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

WASINSKI, B.; DUTKIEWICZ, J. Leptospirosis--current risk factors connected with human activity and the environment. **Ann. Agric. Environ. Med.**, v. 20, n. 2, p. 239-244, 2013.

WIZEMANN, T. M. et al. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 3, p. 1593-1598, 2001.

WOLFF, D. G. et al. Interaction of leptospira elongation factor tu with plasminogen and complement factor h: a metabolic leptospiral protein with moonlighting activities. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e81818, 2013.

WOLGEMUTH, C. W. et al. The flagellar cytoskeleton of the spirochetes. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 11, n. 3-5, p. 221-227, 2006.

WOODWARD, M. P.; YOUNG, W. W., JR.; BLOODGOOD, R. A. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. **J. Immunol. Methods**, v. 78, n. 1, p. 143-153, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.** 2003.

WU, B. T. et al. [The OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar lai induces apoptosis in A549 via Ca²⁺ signal pathway]. **Sichuan. Da. Xue. Xue. Bao. Yi. Xue. Ban.**, v. 42, n. 3, p. 298-302, 2011.

XUE, F.; YAN, J.; PICARDEAU, M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. **Microbes Infect.**, v. 11, n. 3, p. 328-333, 2009.

YAN, W. et al. Identification and characterization of OmpA-like proteins as novel vaccine candidates for Leptospirosis. **Vaccine**, v. 28, n. 11, p. 2277-83, 2010.

_____. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. **Microbes Infect.**, v. 11, n. 2, p. 230-237, 2009.

YU, C. S. et al. Prediction of protein subcellular localization. **Proteins**, v. 64, n. 3, p. 643-651, 2006.

YU, C. S.; LIN, C. J.; HWANG, J. K. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. **Protein Sci.**, v. 13, n. 5, p. 1402-1406, 2004.

ZHANG, K. et al. Leptospiral LruA is required for virulence and modulates an interaction with mammalian apolipoprotein AI. **Infect. Immun.**, v. 81, n. 10, p. 3872-3879, 2013.

ZHANG, L. et al. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. **Mol. Microbiol.**, v. 83, n. 5, p. 1006-1023, 2012.

ZHANG, Y. et al. OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar Lai is cytotoxic to cultured rat renal cells and promotes inflammatory responses. **Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)**, v. 42, n. 1, p. 70-79, 2010.

_____. [Expression and identification of gene Loa22 from the virulent strain of serovar Lai of *L. interrogans* and its cytotoxicity to macrophages]. **Sichuan. Da. Xue. Xue. Bao. Yi. Xue. Ban.**, v. 39, n. 3, p. 351-354, 377, 2008.

ZHONG, Y. et al. Comparative proteogenomic analysis of the *Leptospira interrogans* virulence-attenuated strain IPAV against the pathogenic strain 56601. **Cell. Res.**, v. 21, n. 8, p. 1210-1229, 2011.

ZUERNER, R. L. et al. A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. **Clin. Vaccine. Immunol.**, v. 18, n. 4, p. 684-691, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Cromatogramas do início dos sequenciamentos das construções dos genes no vetor pAE

LIC11009

LIC11360

LIC11975

LIC13011

LIC13477

APÊNDICE B – Otimização da concentração de oligonucleotídeos para utilização na RT-qPCR

16S

LIC11009

LIC11360

LIC11975

APÊNDICE C – Validação do método $\Delta\Delta C_T$ para quantificação relativa da expressão gênica

Curva padrão – Diluição seriada de cDNA

Eficiência da amplificação dos oligonucleotídeos de cada gene

	Eficiência (%)
16S	100
LIC11009	99
LIC11360	99
LIC11975	105

APÊNDICE D – Curvas de dissociação obtidas após as reações de RT-qPCR

- Ensaios utilizando cDNA de leptospiros cultivadas a 28 °C

16S **LIC11009**

LIC11360

LIC11975

- Ensaios utilizando cDNA de leptospiros cultivadas a 37 e 39 °C

16S **LIC11009**

LIC11360

LIC11975

- Ensaios utilizando cDNA de leptospiros cultivadas em meio suplementado com 120 mM NaCl

16S **LIC11009**

LIC11360

LIC11975

- Ensaios utilizando cDNA de leptospiras virulentas

16S

LIC11009

LIC11360

LIC11975

APÊNDICES – Artigos Publicados em Periódicos, Capítulo de Livro e Manuscrito
Submetido

- APÊNDICE E** – SIQUEIRA, G. H. et al. Characterizaion of three novel adhesins of *Leptospira interrogans*. **Am. J. Trop. Med, Hyg.**, v. 89, n. 6, p. 1103-1116, 2013.
- APÊNDICE F** – 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.
- APÊNDICE G** – VIEIRA, M. L. et al. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 352, n. 2, p. 129-139, 2014.
- APÊNDICE H** – DOMINGOS, R. F. et al. Mapeamento de genomas bacterianos: sequenciamento e funcional de leptospiaras. **Biotecnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e Aplicações**, Editores: Rodrigo Resende e Carlos Ricardo Soccol, Ed. Blucher S/A. Capítulo de livro em revisão.
- APÊNDICE I** – ATZINGEN, M. V. et al. Induction of boosted immune response in mice by leptospiral surface proteins expressed in fusion with DnaK. **BioMed Research Intern.** Manuscrito submetido.

Characterization of Three Novel Adhesins of *Leptospira interrogans*

Gabriela H. Siqueira, Marina V. Atzingen, Ivy J. Alves, Zenaide M. de Moraes,
Sílvia A. Vasconcellos, and Ana L. T. O. Nascimento*

Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil; Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia,
Instituto de Ciências Biomédicas, e Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Veterinária Preventiva e Saúde Animal,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract. We report cloning, expression, purification, and characterization of three predicted leptospiral membrane proteins (LIC11360, LIC11009, and LIC11975). *In silico* analysis and proteinase K accessibility data suggest that these proteins might be surface exposed. We show that proteins encoded by LIC11360, LIC11009 and LIC11975 genes interact with laminin in a dose-dependent and saturable manner. The proteins are referred to as leptospiral surface adhesions 23, 26, and 36 (Lsa23, Lsa26, and Lsa36), respectively. These proteins also bind plasminogen and generate active plasmin. Attachment of Lsa23 and Lsa36 to fibronectin occurs through the involvement of the 30-kDa and 70-kDa heparin-binding domains of the ligand. Dose-dependent, specific-binding of Lsa23 to the complement regulator C4BP and to a lesser extent, to factor H, suggests that this protein may interfere with the complement cascade pathways. *Leptospira* spp. may use these interactions as possible mechanisms during the establishment of infection.

INTRODUCTION

Leptospirosis is an acute febrile disease caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. The disease is considered, according to the World Health Organization, as an important emerging infectious disease that affects populations worldwide. In tropical and subtropical regions, the disease is considered endemic, whereas in temperate climate, the disease is more associated with occupational and recreational activities.¹ Structural heterogeneity in the carbohydrate component of leptospiral lipopolysaccharides results in serovar diversity; more than 250 serovars have been described.² Many serovars are adapted for specific mammalian reservoir hosts, which harbor the organisms in their renal tubules and shed live leptospires in their urine. Humans are accidental hosts who become infected through contact with wild or domestic animals or exposure to contaminated soil or water.³

Our laboratory has been using bioinformatics software, such as PSORT⁴ and LipoP,⁵ to analyze genome sequences of *L. interrogans* serovar Copenhageni.^{6,7} This approach, combined with gene cloning and protein expression and purification, has led to development of several leptospiral recombinant proteins that can be experimentally characterized. Some of these proteins were identified as novel leptospiral adhesins that might be involved in the first steps of host-*Leptospira* interaction.^{8–18} After attachment, leptospires have to overcome tissue barriers and reach target organs. Proteolytic activity by plasmin (PLA) generation at the surface of *Leptospira* spp. via binding of host plasminogen (PLG) in the presence of an activator has been described.¹⁹ Furthermore, our group has identified several leptospiral proteins as PLG-binding receptors.^{8,15–18,20} Recently, we have reported two leptospiral proteins capable of binding the complement regulator C4BP, an interaction that might help the bacteria evade the immune system and increase survival.^{17,18}

In the present study, we report the characterization of three novel leptospiral proteins. The selected genes, LIC11009, LIC11360, and LIC11975, were identified in genome sequences

of *L. interrogans* serovar Copenhageni^{6,7} and predicted to encode for membrane proteins. We show that the recombinant proteins bind extracellular matrix (ECM) molecules and are referred to as leptospiral surface adhesions Lsa23 (rLIC11360), Lsa26 (rLIC11009), and Lsa36 (rLIC11975) (number indicates molecular mass of the protein). These proteins are capable of binding PLG and generating enzymatically active PLA. Moreover, Lsa23 interacts with C4BP and factor H complement regulators. These recombinant proteins might be multipurpose leptospiral proteins that participate in bacterial invasion.

MATERIALS AND METHODS

Leptospira strains. The non-pathogenic *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc I; and the pathogenic, *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20, *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain RGA, *L. interrogans* serovar Canicola strain Hond Utrecht IV, *L. interrogans* serovar Pomona strain Pomona, *L. interrogans* serovar Hardjo strain Hardjo-prajitno, *L. borgpetersenii* serovar Whitticombi strain Whitticombi, *L. kirschneri* serovar Cynopteri strain 3522 CT, *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa strain Moskva, and *L. noguchii* serovar Panama strain CZ214 were used. Strains were cultured at 28°C under aerobic conditions in liquid Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris medium (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) with 10% rabbit serum, enriched with 0.015% L-asparagine, 0.001% sodium pyruvate, 0.001% calcium chloride, 0.001% magnesium chloride, 0.03% peptone, and 0.02% meat extract.²¹

Extracellular matrix and biologic components. Laminin, collagen, plasma, cellular and proteolytic fragments of fibronectin (70, 45, and 30 kDa), elastin, vitronectin, complement, and control protein fetuin were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Laminin-1 and collagen type IV were derived from the basement membrane of Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma; cellular fibronectin was derived from human foreskin fibroblasts; plasma and proteolytic fragments of fibronectin, vitronectin, and human complement serum were isolated from human plasma; elastin was derived from human aorta; and collagen type I was isolated from rat tail. Native PLG, purified from plasma human, and factor H were obtained from EMD Chemicals, Inc. (San Diego, CA). C4BP, isolated

*Address correspondence to Ana L. T. O. Nascimento, Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: ana.nascimento@butantan.gov.br

from normal human serum, was obtained from Complement Technology, INC. (Tyler, TX).

Microscopic agglutination test. The microscopic agglutination test (MAT) was performed according to Faine and others.³ In brief, 20 serovars of *Leptospira* spp. were used as antigens: Australis, Autumnalis, Bataviae, Canicola, Castelloni, Copenhageni, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Sejroe, Tarassovi, and Wolffi. All strains were maintained in liquid Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris medium at 29°C. A laboratory-confirmed case of leptospirosis was defined by the demonstration of a four-fold increase in micro-agglutination titer between paired serum samples. The probable predominant serovar was considered to be the one with the highest dilution that could cause 50% of agglutination. The MAT result was considered negative when the titer was < 100.

In silico analysis of proteins. Putative coding sequences (CDSs) LIC11009, LIC11360 and LIC11975 were identified in the *L. interrogans* serovar Copenhageni genome^{6,7} and selected based on their cellular localization predicted by PSORT⁴ (<http://psort.nibb.ac.jp>), and CELLO²² (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) programs. Locations predicted by these programs are cytoplasmic, cytoplasmic membrane, periplasmic, outer membrane, and extracellular (by PSORT), and cytoplasmic, periplasmic, outer membrane, inner membrane, and extracellular (by CELLO). The SMART²³ (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) and PFAM²⁴ (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) web servers were used to search for predicted functional and structural conserved domains, and Lipop⁵ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) and SignalP²⁵ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) programs were used to evaluate the presence of lipobox/signal peptide putative sequences. Conservation of CDSs was performed by BLAST²⁶ using Conserved Domain Database.²⁷ CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) was used to generate the phylogram for each CDS.²⁸

DNA isolation and polymerase chain reaction analysis. *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain M-20 cultures were harvested by centrifugation at 11,500 × *g* for 30 minutes and gently washed in sterile phosphate-buffered saline (PBS) twice. Genomic DNA was isolated from the pellets by using the guanidine-detergent lysing method with DNazol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions. The 648-basepair LIC11009,

the 602-basepair LIC11360, and the 978-basepair LIC11975 DNA fragments were amplified using oligonucleotides designed according to *L. interrogans* serovar Copenhageni genome sequences (GenBank accession no. AE016823) and are shown in Table 1. The polymerase chain reaction (PCR) was performed in a reaction volume of 25 µL containing 100 ng of genomic DNA, 1 × PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM of each specific primer, 200 µM of each dNTP, and 1 unit of Taq polymerase. Cycling conditions were 94°C for 4 minutes; followed by 35 cycles at 94°C for 50 seconds, 59°C (LIC11009)/64°C (LIC11360)/51°C (LIC11975), for 50 seconds, and 72°C for 2 minutes; and a final extension cycle at 72°C for 7 minutes. Amplicons were loaded on a 1% agarose gel for electrophoresis and visualization with GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA).

Gene cloning and recombinant protein expression and purification. Predicted CDSs LIC11009, LIC11360 and LIC11975 were amplified, without signal peptides, by the PCR from *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20 genomic DNA using the specific primer pairs shown in Table 1. Gel-purified PCR fragments (Illustra GFX PCR DNA and Gel band purification kit; GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ) were subcloned into the pGEM-T easy vector (Promega, Prodlimol, Minas Gerais, Brazil) and cloned into the pAE²⁹ expression vector at *Xho*I and *Hind*III (LIC11009 and LIC11975) or *Bam*HI and *Hind*III restriction sites (LIC11360). The pAE vector enables expression of recombinant proteins with a minimal 6XHis-tag at the N-terminus. All cloned sequences were confirmed by DNA sequencing with an ABI 3100 automatic sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

Protein expression of recombinant proteins was performed in the *Escherichia coli* BL21 (SI) strain by action of T7 DNA polymerase under control of the osmotically induced promoter *proU*.³⁰ *Escherichia coli* BL21 (SI) host cells were transformed with the recombinant plasmids and grown at 30°C in Luria-Bertani broth without NaCl and with 100 µg/mL of ampicillin with continuous shaking until an optical density (OD) at 600 nm of 0.6–0.8 was reached. Recombinant protein synthesis was induced for 3 hours by addition of 300 mM (rLIC11360 and rLIC11975) or 150 mM (rLIC11009) NaCl. Bacterial cells were then harvested by centrifugation, and bacterial pellets were resuspended in lysis buffer (200 µg/mL of lysozyme, 1% Triton X-100, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and lysed on ice with a cell disruptor (Ultrasonic Processor;

TABLE 1

Gene locus, protein name, GenBank reference sequence number, features, sequence of the primers used for DNA amplification, and molecular mass of expressed recombinant proteins of *Leptospira interrogans*

Gene locus*	Recombinant protein	GenBank accession number†	Genome annotation	Sequence of primers for polymerase chain reaction amplification and restriction cloning sites‡	Recombinant protein molecular mass (kDa)
LIC11009	Lsa26	AAS69619.1	<i>Leptospira</i> conserved hypothetical protein	F:5'-CTCGAGGAAGGTTGGGCAGTAGTAAATT-3' (<i>Xho</i> I); R:5'-AAGCTTTCACCTTTTCAAATCGGTATA AAC-3' (<i>Hind</i> III)	25.66
LIC11360	Lsa23	AAS69961.1	Lipoprotein, probable	F:5'-GGATCCGAACTTCCTTACTTTTCCCCTAAC-3' (<i>Bam</i> HI); R:5'-AAGCTTGAATGTTGACTAGAGGCAT TTACT-3' (<i>Hind</i> III)	22.53
LIC11975	Lsa36	AAS70551.1	Outer membrane protein	F:5'-CTCGAGGAATGTAGCGGTGCGG-3' (<i>Xho</i> I); R:5'-AAGCTTTCATCCCAAAGATAATTCA-3' (<i>Hind</i> III)	36.12

*<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>.

†<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>.

‡F = forward; R = reverse. Restriction cloning sites are underlined.

GE Healthcare). Insoluble fractions were resuspended in a buffer containing 100 mM Tris, pH 12.0, 500 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol, 0.1% Triton X-100, and 8 M urea for rLIC11360 or 100 mM Tris-HCl or Tris, 500 mM NaCl, and 8 M urea for rLIC11009 and rLIC11975, using buffer pH of 8.0 and 12.0, respectively.

Recombinant proteins were purified by using metal chelating chromatography in a Sepharose fast flow column (GE Healthcare). The rLIC11360 protein was refolded by diluting 1:500 with 100 mM Tris, pH 12.0, and 500 mM NaCl before chromatographic purification. The rLIC11009 and rLIC11975 proteins were refolded in a column by gradually removing urea (4 to 0 M). Fractions were analyzed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 15% polyacrylamide gel and fractions that contained recombinant proteins were extensively dialyzed against Tris-NaCl, pH 12.0 containing 0.1% glycine for rLIC11360 and rLIC11975, and PBS containing 0.1% glycine for rLIC11009.

Circular dichroism spectroscopy. Recombinant proteins Lsa26 and Lsa36 were dialyzed against sodium phosphate buffer, pH 7.4, and recombinant protein Lsa23 was dialyzed against 10 mM Tris, pH 12.0. Circular dichroism (CD) spectroscopy measurements were performed at 20°C by using a Jasco J-810 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan) equipped with a Peltier unit for temperature control. Far-ultraviolet CD spectra were measured by using a 1-mm path-length cell at 0.5-nm intervals. Spectra are presented as an average of five scans recorded from 185 to 260 nm. Residual molar ellipticity is expressed in degree X centimeter per decimole. Spectra data were analyzed by using K2D3 software (<http://www.ogic.ca/projects/k2d3/>) and the method that calculated the secondary structure content from the experimental data.³¹

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human antibodies. Human IgG against Lsa26, Lsa23, and Lsa36 was detected by using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described.³² In brief, positive MAT serum samples from 16 confirmed-leptospirosis patients were diluted 1:200 and evaluated for total IgG by using horseradish peroxidase (HRP)–conjugated goat anti-human IgG antibodies (1:5,000) (Sigma-Aldrich). Data were analyzed by using Graph Pad Prism software version 3.0 (Graphpad, San Diego, CA). The cutoff value for each recombinant protein was calculated as described by Flannery and others,³³ and defined as the absorbance value for the 96th percentile of two commercial pools of healthy human sera (Sigma-Aldrich and Complement Tech.).

Antiserum. Five female BALB/c mice (4–6 weeks old) were immunized subcutaneously with 10 μ g of the recombinant proteins adsorbed in 10% (v/v) Alhydrogel (2% Al(OH)₃; Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark) used as adjuvant. Two subsequent booster injections were given at two-week intervals with the same recombinant proteins preparation. Negative control mice were injected with PBS plus Alhydrogel. Two weeks after each immunization, the mice were bled from the retro-orbital plexus and pooled serum was analyzed by ELISA for determination of antibody titers.

Immunoblotting assay. The purified recombinant proteins subjected to SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel and transferred into nitrocellulose membranes (Hybond ECL; GE Healthcare) in semi-dry blotting equipment (GE Healthcare).

Membranes were blocked overnight at 4°C with 10% non-fat dried milk in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and then incubated with anti-Lsa26, anti-Lsa23, anti-Lsa36 mouse serum diluted 1:50, or mouse anti-His tag monoclonal antibody (GE Healthcare) diluted 1:1,000 for 3 hours at room temperature. After washing, the membranes were incubated with HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (diluted 1:5,000; Sigma-Aldrich) in PBS-T with non-fat milk for 1 hour. Protein reactivity was determined by using the ECL reagent kit chemiluminescence substrate (GE Healthcare) with subsequent exposure to x-ray film or using Carestream Molecular Imaging connected to Gel Logic 2200PRO (Equilab, Whitestone, NY).

Distribution of proteins among leptospiral strains. Bacterial cultures of *Leptospira* spp. were harvested by centrifugation, washed three times with PBS containing 5 mM MgCl₂, and resuspended in PBS containing 9% SDS. Purified recombinant proteins or protein extracts from leptospires were subjected to SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL; GE Healthcare) in semi-dry blotting equipment (GE Healthcare), and analyzed as described above.

Proteinase K accessibility assay. Enzymatic digestion was performed as described by Oliveira and others¹⁴ with some modifications. In brief, 5-mL suspensions of live leptospires (*L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20)/per each treatment (approximately 10⁸ cells/mL) were harvested by centrifugation at 8,000 $\times$ g for 10 minutes at room temperature and washed once with PBS low salt containing 50 mM NaCl (PBS ls). Leptospires were resuspended in 5 mL of proteolysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM CaCl₂) containing 25 μ g/mL of proteinase K (PK) (Sigma-Aldrich). Test tubes were incubated for 0–240 minutes at 37°C and aliquots were obtained at 0, 30, 60, 120, and 240 minutes before the addition of 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride to stop PK activity. Suspensions were subsequently centrifuged at 11,500 $\times$ g for 5 minutes, washed twice with PBS ls, and resuspended in PBS ls for an ELISA with antibodies against Lsa26, Lsa23, Lsa36, LipL32, and DnaK, as described below. LipL32 and DnaK are membrane³⁴ and cytoplasmic³⁵ leptospiral proteins and were used in our experiment as positive and negative controls, respectively.

ELISA for cellular localization detection of proteins. *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain M-20 (approximately 10⁷ cells/well) were coated onto microplates (Costa High Binding; Corning, Tewksbury, MA) and allowed to stand at room temperature for 16 hours. The plates were washed three times with PBS ls and blocked for 2 hours at 37°C with PBS ls containing 5% non-fat dry milk and 1% bovine serum albumin (BSA). After incubated for 2 hours at 37°C with polyclonal mouse anti-serum against rLIC11009, rLIC11360, rLIC11975, LipL32, or DnaK (dilution of an OD = 1) the leptospires were washed three times with PBS ls and incubated for 1 hour at 37°C with 50 μ L of a 1:5,000 dilution of HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) in PBS ls. The wells were washed three times with PBS ls and *o*-phenylenediamine (Sigma-Aldrich) (1 mg/mL) in citrate phosphate buffer, pH 5.0, plus 1 μ L/mL of H₂O₂ was added (100 μ L/well). The reaction proceeded for 15 minutes and was stopped by the addition of 50 μ L of 4 N H₂SO₄. The absorbance at 492 nm was determined in a microplate reader (Multiskan EX; Thermo Fisher Scientific, Helsinki, Finland) against the OD of blanks that contained the reaction mixture

except for antibodies against the recombinant proteins. For statistical analyses, binding of polyclonal mouse anti-serum against Lsa26, Lsa23, Lsa36, LipL32, or DnaK at 0 hours of incubation was compared with other incubations by using Student's two-tailed *t*-test.

Interaction of recombinant proteins with ECM and plasma components. Protein attachment to individual macromolecules of the ECM and plasma components was analyzed according to a published protocol¹¹ with some modifications. In brief, 96-well plates were coated with 1 μ g of laminin, collagen type I, collagen type IV, cellular fibronectin, plasma fibronectin, fibronectin proteolytic fragments (30 kDa, 45 kDa, and 70 kDa), elastin, vitronectin, human PLG, complement mixture, factor H, C4BP, BSA, gelatin (negative controls) or fetuin (highly glycosylated attachment; negative control protein) in 100 μ L of PBS for 3 hours at 37°C. The wells were washed three times with PBS-T and blocked with 200 μ L of PBS-T containing 10% (w/v) non-fat dry milk for 1 h at 37°C, followed by an overnight incubation at 4°C. One microgram of each recombinant protein was added per well in 100 μ L of PBS, and protein was allowed to attach to the different substrates for 90 minutes at 37°C. After washing six times with PBS-T, bound recombinant proteins was detected by adding an appropriate dilution ($OD_{492nm} = 1.0$) of mouse anti-recombinant proteins in 100 μ L of PBS as follows: Lsa26, (1:1,000), Lsa23 and Lsa36 (1:500). Incubation proceeded for 1 h at 37°C. After three washings with PBS-T, 100 μ L of a 1:5,000 dilution of HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) in PBS was added per well and samples were incubated for 1 hour at 37°C. Wells were washed three times and *o*-phenylenediamine (Sigma-Aldrich) (1 mg/mL) in citrate phosphate buffer, pH 5.0, plus 1 μ L/mL of H₂O₂ was added (100 μ L/well). The reaction was allowed to proceed for 15 minutes and stopped by the addition of 50 μ L of 4 N H₂SO₄. Readings were taken at 492 nm in a microplate reader (Multiskan EX; Thermo Fisher).

For statistical analyses, the binding of recombinant proteins to ECM macromolecules and plasma components was compared with its binding to BSA, fetuin, and gelatin by using Student's two-tailed *t*-test, and *P* values were given related to comparison to fetuin, which was used as a negative control for the following experiments. Bindings were also confirmed in another assay that used HRP-conjugated mouse anti-His tag monoclonal antibodies (Sigma-Aldrich) previously titrated against the recombinant protein and used at a dilution that had an $OD_{492 nm} = 1.0$ (1:10,000).

Dose-response curves. For determination of dose-dependent attachment of recombinant proteins to ECM macromolecules and plasma components, ELISA plates were coated with 100 μ L of 10 μ g/mL of ECM and plasma components and allow to adhere for 3 hours at 37°C. Plates were then washed with PBS-T and blocked for 1 hour at 37°C, followed by an overnight incubation at 4°C. Increasing concentrations of the purified recombinant proteins in PBS (100 μ L/well) were added and incubated for 90 minutes at 37°C. Assessment of bound protein was performed by incubation for 1 hour at 37°C with antiserum raised against recombinant proteins, followed by HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG, as described above. The ELISA data were used to calculate the dissociation constant (K_D) according to the method described³⁶ based on the equation $K_D = (A_{max} [protein])/A - [protein]$, where *A* is the absorbance at a given protein concentration, *A*_{max} is the maximum absorbance for the ELISA plate reader

(equilibrium), [protein] is the protein concentration, and K_D is the dissociation equilibrium constant for a given absorbance at a given protein concentration (ELISA data point).

Characterization of protein binding to plasma fibronectin and PLG. To determine the role of lysine in PLG-recombinant proteins interactions, the lysine analog 6-aminocaproic acid (ACA) (Sigma-Aldrich) was added with recombinant proteins at a final concentration of 2 mM or 20 mM to PLG-coated wells. The capacity of heparin to compete for binding of rLIC11360 and rLIC11975 to plasma fibronectin proteolytic fragments F70 and F30 was performed by incubating 1 μ M of recombinant proteins with different concentrations of heparin (0–350 IU) (Sigma-Aldrich); mixtures were then added to the F70- or F30-coated wells. In both experiments, detection of bound recombinant proteins was performed as described above.

PLA enzymatic activity assay. Ninety-six well ELISA plates were coated overnight with 10 μ g/mL of recombinant proteins or BSA (negative control) in 100 μ L of PBS at 4°C. Plates were washed once with PBS-T and blocked for 2 hours at 37°C with PBS with 10% (w/v) non-fat dry milk. The blocking solution was discarded and 100 μ L/well of 10 μ g/mL human PLG was added, followed by incubation for 2 hours at 37°C. Wells were washed three times with PBS-T, and 4 ng/well of human urokinase-type PLG activator (uPA; Sigma-Aldrich) was added. Subsequently, 100 μ L/well of PLA-specific substrate D-valyl-leucyl-lysine-*p*-nitroanilide dihydrochloride (Sigma-Aldrich) was added at a final concentration of 0.4 mM in PBS. Plates were incubated overnight at 37°C and substrate degradation was measured by taken the readings in a microplate reader at 405 nm.

Ethics. All animal studies were approved by the Ethics Committee of the Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil, under protocol number 768/10. This Committee adopts the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation. Confirmed leptospirosis human serum samples were obtained from the Instituto Adolfo Lutz collection, Santos, SP, Brazil. Samples were used for research purposes only.

Statistical analysis. All results are expressed as means $\pm$ SD. Student's paired *t*-test was used to determine the significance of differences between means, and *P* < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Bioinformatics of the coding sequences. The genes LIC11009, LIC11360, and LIC11975 were identified by analysis of the genome sequences of the chromosome I of *L. interrogans* serovar Copenhageni; each gene is present as a single copy.⁷ The CDSs LIC11009, LIC11360, and LIC11975 are predicted to be outer membrane proteins based on PSORT⁴ and for LIC11975 and LIC11009 also by CELLO²² programs. No putative conserved domains have been detected by BLAST.^{26,37} BLAST analysis of the three CDSs showed that they are present in several strains of *Leptospira* spp. In the case of LIC11975, a sequence with partial similarity (38%) was identified in the saprophytic strains of *L. biflexa*, Patoc 1 (Ames) and Patoc 1 (Paris). Multiple sequence alignment was performed with the CLUSTAL 2.1²⁸ program comparing the CDSs LIC11009 (Figure 1A), LIC11360 (Figure 1B), and LIC11975 (Figure 1C) with sequences available in GenBank. The depicted phylograms clearly show that the three coding

FIGURE 1. Analysis of LIC11009, LIC11360, and LIC11975 coding sequence conservation among strains of *Leptospira* spp. by Clustal W2 alignments. Blast analyses were assessed among sequences in GenBank, and leptospiral sequences were used to perform sequence alignment. Phylograms of all sequence alignments show the proximity of LIC11009 (A), LIC11360 (B), and LIC11975 (C) within pathogenic strains of *Leptospira* spp. The distant branches show the saprophytic strains.

sequences are well conserved among several pathogenic strains of *Leptospira*. In the case of LIC11975, similarity/proximity with the sequence present in pathogenic strains is shown; the sequences present in saprophytic strains have lower similarity and are organized in a more distant branch (Figure 1C). General features of Lsa26, Lsa23, and Lsa36 are summarized in Table 1. The CDSs have been identified by proteomics in

L. interrogans serovar Copenhageni strain FIOCRUZ L1-130, but only in the case of LIC11009 could the number of copies per cell be determined (2,566), and LIC11360 and LIC11975 are probably expressed in amounts below the detection limit of the method.³⁸

Expression, purification, and identification of recombinant proteins. The amplified coding sequences, excluding the signal

peptide sequences, were cloned and expressed as full-length proteins in *E. coli* and carried a 6XHis tag at the N-terminal. Gene locus, protein reference number, given name, sequences of primers used for PCR amplifications and molecular mass of recombinants are shown in Table 1. The recombinant proteins were expressed in insoluble form, purified under denaturing conditions by nickel-affinity chromatography, followed by refolding. An aliquot of each step of the process was analyzed by SDS-PAGE for the proteins (Figure 2A). The purified proteins were represented by major bands (Figure 2B), but in the case of Lsa36, other protein bands of lower molecular mass were also present, probably because of degradation during the purification step. To further confirm that these proteins are His-tag recombinants, we conducted immunoblotting and probed samples with monoclonal mouse His-tag antibodies (GE Healthcare). Results are as shown in Figure 2C. Anti-His tag antibodies recognized the three recombinant proteins. Similar data were obtained when blotted recombinant proteins were probed with the respective polyclonal antiserum raised in mice (Figure 2D). Structural integrity of the purified proteins was assessed by CD spectroscopy. This method eval-

uates the secondary structure content of protein and is important data to obtain after protein refolding. The CD spectra for the three proteins are shown in Figure 2E. Analysis of the spectra data by K2D3³¹ software showed 43.15% β strand and 3.27% alpha helix for Lsa26, 35.95% β strand and 9.5% alpha helix for Lsa23, and 8.34% of β strand and 55.67% alpha helix for Lsa36. These data validate protein integrity for further studies.

Protein distribution among leptospiral strains. Protein expression and conservation among *Leptospira* strains was assessed with total protein extracts of pathogenic strains of *Leptospira* spp. and the non-pathogenic strain *L. biflexa* serovar Patoc. Cell extracts were gel fractionated, proteins blotted onto membranes, and probed with the respective polyclonal antiserum raised in mice. Proteins Lsa23 and Lsa36 were not identified in any leptospiral protein extracts assayed by Western blotting. Protein Lsa26 was detected in the bacterial extracts of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20, *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain RGA, *L. interrogans* serovar Canicola strain Hound Utrecht IV, *L. interrogans* serovar Pomona strain Pomona,

FIGURE 2. Analysis of recombinant proteins of *Leptospira interrogans* by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and staining with Coomassie blue, Western blotting, and circular dichroism. **A**, Lsa26, Lsa23, and Lsa36 expression from NaCl-induced *Escherichia coli* BL21-SI. M = molecular mass marker; NI = non-induced total bacterial extract; I = total bacterial cell lysates after induction; S = soluble fraction of the induced culture in the presence of 8 M urea; In = insoluble fraction of the induced culture. **B**, Purified recombinant proteins. **C** and **D**, Western blotting analyses of the recombinant proteins probed with monoclonal anti-His tag antibodies (1:1,000) (**C**) and correspondent antiserum produced in mice against each recombinant protein (diluted 1:5,000) (**D**). **E**, ECD spectra of Lsa26, Lsa23, and Lsa36 recombinant proteins are depicted after refolding. Far-ultraviolet CD spectra are shown as an average of five scans from 185 to 260 nm (**E**). Values on the left are in kilodaltons.

FIGURE 3. Protein distribution (Lsa26) among strains of *Leptospira interrogans*. Whole bacterial cell lysates and Lsa26 were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes. Antiserum against recombinant Lsa26 was used as probe (diluted 1:50). Reactivity was shown by using an ECL reagent kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ) and subsequent exposures with Gel Logic 2200 equipment (Equilab, Whitestone, NY). Recombinant protein Lsa26 was used as a marker.

and *L. interrogans* serovar Hardjo strain Hardjo-prajitno (Figure 3). This protein was not identified in the extracts of the pathogenic *L. borgpetersenii* serovar Whitticombi strain Whitticombi, *L. kirschneri* serovar Cynopteri strain 3522 CT, *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa strain Moskva, *L. noguchii* serovar Panama, and saprophytic *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc.

Reactivity of recombinant proteins with serum from patients with leptospirosis. To investigate whether LIC11009, LIC11360, and LIC11975 leptospiral coding sequences are capable of promoting an immune response from an infected host, we evaluated the reactivity of the recombinant proteins by determining the amount of corresponding IgG present in serum samples of patients with leptospirosis. We performed an ELISA using 16 serum samples and calculated the cutoff value, as described in the Materials and Methods. The results shown in Figure 4 indicate that three proteins reacted with the serum samples; Lsa26 had the highest number of responders (93.8%), followed by Lsa23 (68.8%) and Lsa36 (62.5%). Our data suggest that the proteins are expressed during leptospiral infection.

Cellular localization of Lsa26, Lsa23, and Lsa36 by protease assays. We performed a proteinase K accessibility assay by using a described assay^{14,39} with some modifications. Live *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20 was treated with 25 µg/mL of proteinase K, and aliquots of the bacterial suspensions were obtained at 0, 30, 60, 120, and 240 minutes. The suspensions were centrifuged and resuspended bacteria were used to coat microplates, followed by incubation with polyclonal antibodies against each protein, including the controls, LipL32 and DnaK, for outer³⁴ and cytoplasmic³⁵ protein, respectively. Proteins Lsa26, Lsa23, and Lsa36 were susceptible to protease treatment and showed statistically significant values after 60 minutes of incubation, when compared with 0 min control samples (Figure 5). Protein remaining

FIGURE 4. Reactivity of recombinant proteins Lsa26, Lsa23 and Lsa36 of *Leptospira interrogans* with serum samples of persons given a diagnosis of leptospirosis. Positive serum samples (responders) were determined by using an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant proteins and serum samples from patients. Reactivity was evaluated as total IgG. The cutoff value (horizontal lines) for each recombinant protein was defined as the absorbance (Abs.) value for the 96th percentile of two commercial pools of healthy human serum.

was 53%, 55%, and 72% for Lsa26, Lsa23, and Lsa36, respectively, contrasting with 36% of the major control protein LipL32 that remained intact after only 30 minutes of incubation. Nearly no reduction was observed for the DnaK cytoplasmic protein (Figure 5).

Adhesion of Lsa26, Lsa23, and Lsa36 proteins to ECM components. The Lsa26, Lsa23, and Lsa36 proteins are probably surface exposed. We evaluated whether they could mediate

FIGURE 5. Protease accessibility assay of LIC11009, LIC11360 and LIC11975 coding sequences of *Leptospira interrogans*. Viable *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20 were incubated with 25 µg/mL of proteinase K at the indicated times (in minutes). Suspensions were centrifuged, washed, resuspended in phosphate-buffered saline, coated onto a microplate. Antibodies against Lsa26, Lsa23, Lsa36 were used. Antiserum against the outer membrane protein LipL32 and the cytoplasmic leptospiral protein DnaK were used as positive and negative controls, respectively. Parallel blanks were run without antibodies against the recombinant proteins. Bars represent the mean $\pm$ SD absorbance of three replicates for each protein and are representative of two independent experiments. For statistical analyses, the optical density value after treatment with proteinase K was compared with the value at 0 hours incubation by a two-tailed *t*-test (**P* < 0.05).

FIGURE 6. Interaction of recombinant proteins of *Leptospira interrogans* with extracellular matrix (ECM) components. **A**, One microgram of ECM macromolecules was coated onto enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) microplates wells after incubation with 1 μ g of Lsa26, Lsa23, or Lsa36. Bovine serum albumin, gelatin, and fetuin were used in the place of ECM as negative controls for nonspecific binding. Binding was evaluated by ELISA. Bars represent the mean $\pm$ SD absorbance at 492 nm of three replicates for each protein and are representative of two independent experiments. For statistical analyses, the interaction of recombinant proteins with ECM was compared with its binding to fetuin by two-tailed *t*-test (* $P < 0.05$). **B** and **C**, Lsa23 and Lsa36, and Lsa26 dose-dependent binding experiments with laminin, respectively. Binding was detected by polyclonal antibodies against each recombinant protein; fetuin was included as a negative control. Dissociation constant data are shown in Table 2.

host colonization by adhering to extracellular matrix proteins. Thus, laminin, collagen type I, collagen type IV, cellular fibronectin, vitronectin, elastin, and control proteins BSA, fetuin, and gelatin were immobilized on 96-well micro-dilution plates, and recombinant protein attachment were assessed by using an ELISA, as described by Atzingen and others.¹¹ As shown in Figure 6A, the three proteins exhibited statistically significant adhesiveness to laminin ($P < 0.05$), and Lsa23 also showed significant binding to collagen I. These proteins were then referred to as Lsa23, Lsa26, and Lsa36 (leptospiral surface adhesion) and their molecular masses were determined (Table 1). No statistically significant adhesiveness was observed with the three recombinant proteins when wells were coated with collagen type IV, cellular fibronectin, vitronectin, elastin, BSA, gelatin, or the highly glycosylated control fetuin.

The interaction between the proteins and laminin was also assessed on a quantitative basis by varying protein concentration, as shown in Figure 6B and C. A dose-dependent and saturable binding was observed when increasing concentrations of the recombinant protein from 0 to 1 μ M for Lsa23 and Lsa36 (Figure 6B) and from 0 to 4 μ M for Lsa26 (Figure 6C) were

allowed to adhere to a fixed laminin concentration (1 μ g). Binding saturation level was reached with protein concentrations of 0.2, 0.6, and 2.5 μ M for Lsa23, Lsa36, and Lsa26, respectively. Calculated K_D values are shown in Table 2. Binding of the proteins to laminin was also detected when monoclonal mouse anti-polyhistidine antibodies were used to probe the attachment to laminin. Binding of Lsa23 to collagen I detected

TABLE 2
Dissociation constants for binding of recombinant proteins with *Leptospira interrogans* extracellular matrix and plasma components*

Proteins	Lsa26 (nM)	Lsa23 (nM)	Lsa36 (nM)
Laminin	952.2 $\pm$ 418.9	25.1 $\pm$ 4.1	120.8 $\pm$ 97.6
Plasma fibronectin	—	528.7 $\pm$ 143.5	34.8 $\pm$ 10.4
F70	—	ND	5.1 $\pm$ 1.2
F30	—	ND	24.5 $\pm$ 2.9
Plasminogen	6.4 $\pm$ 2.5	11.7 $\pm$ 1.4	17.8 $\pm$ 5.5
C4BP	—	17.6 $\pm$ 3.5	—
Factor H	—	ND	—

*Values are mean $\pm$ SD. — = non-reactive; ND = not determined.

in the screening assay shown in Figure 6A was not confirmed when the reaction was evaluated in a quantitative manner.

Binding of human plasma components by Lsa23, Lsa26, and Lsa36. Previous work by our group has shown that several proteins may probably act as PLG receptors.^{8,15,16,20,40} We have also described leptospiral proteins that in addition to binding PLG can also interact with the complement regulator C4BP.^{17,18} We evaluated whether the Lsa23, Lsa26, and Lsa36 proteins could also interact with plasma components *in vitro*. Our data showed that the three proteins bound

human PLG ($P < 0.05$), Lsa23 and Lsa36 bound fibronectin ($P < 0.05$), and Lsa23 interacted with the complement regulator factor H ($P < 0.05$) and C4BP ($P < 0.05$) (Figure 7A). None of the proteins interacted significantly with BSA, fetuin, or gelatin control proteins (Figure 7A). Binding between the recombinant proteins and PLG is dose-dependent and saturable when increasing concentrations of the recombinant proteins (0–0.8 μM) were allowed to react with a fixed (1 μg) PLG concentration (Figure 7B). The reaction equilibrium was reached at protein concentration of 0.2 μM , and the calculated

FIGURE 7. Attachment of Lsa26, Lsa23 and Lsa36 proteins of *Leptospira interrogans* to plasma components. **A**, Wells were coated with 1 μg of each plasma component or control proteins bovine serum albumin, gelatin, and fetuin followed by incubation with 1 μg of recombinant proteins per well. Binding was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Data represent the mean $\pm$ SD absorbance at 492 nm of three replicates for each protein and are representative of two independent experiments. For statistical analyses, the attachment of recombinant proteins to plasma components was compared with its binding to fetuin by two-tailed t -test ($*P < 0.05$). Proteins that showed reactivity were further assayed with the respective component. Dose-dependent binding experiments with plasminogen (**B**), plasma fibronectin (**C** and **D**), C4BP (**E**), and with factor H (**F**). One microgram of each plasma component was immobilized onto 96-well ELISA plates and increasing concentrations of each recombinant protein were added. Binding was detected by using antiserum raised in mice against each recombinant protein at an appropriate dilution. Fetuin was included as a negative control. Each experiment was performed in triplicate and expressed as the mean $\pm$ SD absorbance at 492 nm for each point and are representative of two independent experiments. Calculated equilibrium constants are shown in Table 2. Attachment of Lsa23 with factor H was compared with its binding to fetuin by two-tailed t -test ($*P < 0.05$).

dissociation constants are shown in Table 2. Binding of Lsa23 and Lsa36 to plasma fibronectin is dose-dependent when increasing concentrations of the recombinant protein Lsa23 (0–5.0 μ M) (Figure 7C) or Lsa36 (0–0.8 μ M) (Figure 7D) were allowed to react with a fixed (1 μ g) fibronectin concentration. The reaction saturation was reached at protein concentration of 3.5 and 0.4 μ M for Lsa23 and Lsa36, respectively, and the calculated dissociation constants are shown in Table 2. The interaction of Lsa23 with the complement regulators C4BP and factor H was dose-dependent but with distinct affinities (Figure 7E and F). Increasing Lsa23 concentration bound to a fixed concentration of C4BP (1 μ g) in a dose-dependent manner; saturation was reached at an Lsa23 concentration of 50 nM (Figure 7E) and showed a dissociation constant of 17.63 ± 3.46 nM. The interaction of Lsa23 with factor H was also dose-dependent, but saturation was not reached up to the 6.0 μ M recombinant protein concentration (maximum protein concentration achieved) and the OD_{492nm} was < 0.5 (Figure 7F).

Binding of recombinant proteins to PLG via kringle domains. The PLG kringle domains frequently participate in the interaction of lysine residues with bacterial protein receptors.⁴¹ We have shown that these domains participate in the binding of PLG with intact live *L. interrogans* serovar Copenhageni strain L1–130 because the derivative and analog of lysine, ACA, almost totally inhibited binding.¹⁹ We evaluated the participation of lysine residues in binding of the recombinant proteins to PLG by the addition of ACA to the reaction mixtures. A strong, statistically significant inhibition of the interaction of Lsa26, Lsa23, and Lsa36 with PLG was observed when 2 mM ACA was added to the reaction (Figure 8A). The results strongly suggest the participation of the kringle domains in the interaction of Lsa23, Lsa26, and Lsa36 proteins with PLG.

Generation of PLA from PLG-bound recombinant proteins. We have shown that enzymatically active PLA is generated by PLG bound to the surface of *L. interrogans* when its activator is present.¹⁹ To assess whether the PLG bound to Lsa23, Lsa26, and Lsa36 generates proteolytic activity, as reported for other recombinant proteins,^{8,15–17,20,40} a microplate was coated with each recombinant protein, blocked, and then incubated with PLG. Unbound PLG was removed and urokinase (uPA)-type PLG activator (Sigma-Aldrich) was added. The reaction was incubated overnight, and the PLA activity was evaluated by measuring the cleavage of the PLA-specific substrate D-valyl-leucyl-lysine-*p*-nitroanilide dihydrochloride (Sigma-Aldrich) at 405 nm. The PLG captured by the three recombinant proteins could be converted into PLA, as indirectly demonstrated by specific proteolytic activity (Figure 8B). Negative controls without PLG, uPA, or chromogenic substrate showed no enzymatic activity.

Interaction of Lsa23 and Lsa36 with F30- and F70-kDa fragments of fibronectin. Recombinant proteins Lsa23 and Lsa36 bind to plasma fibronectin (Figure 7C and D). We further characterized this binding by evaluating the reactivity of the recombinant proteins with the F30-, F45-, and F70-kDa fragments of fibronectin. The experiments were similar to the one described for the reactivity with plasma components in which 1 μ g of the protein reacted with the immobilized fragment. Interaction with the fibronectin fragments was detected with Lsa23 and Lsa36 and F30 and F70 kDa, but no attachment was seen with the F45-kDa fragment and both proteins (Figure 9A and B). Binding was analyzed in a quantitative

FIGURE 8. Role of lysine residues in recombinant protein-plasminogen (PLG) interaction and generation of plasmin (PLA) in *Leptospira interrogans*. **A**, Binding of Lsa26, Lsa23, and Lsa36 (10 μ g/mL) to PLG was conducted in the presence or absence (no inhibition) of the lysine analog 6-aminocaproic acid (ACA). Bound PLG was detected and quantified by specific antibodies for each recombinant protein. Bars represent the mean $\pm$ SD absorbance at 492 nm of three replicates and are representative of two independent experiments. Attachment of recombinant protein in the presence of ACA was compared with its binding to PLG in the absence of ACA by two-tailed *t*-test (**P* < 0.05). **B**, PLA generation by PLG bound to recombinant proteins was assayed by using a modified enzyme-linked immunosorbent assay. Immobilized recombinant proteins were treated as follows: PLG + urokinase-type PLG activator [uPA] + specific PLA substrate (PLG + uPA + S) or controls lacking one of the three components (PLG + uPA; PLG + S; uPA + S). Bovine serum albumin (BSA) was used as a negative control. Bars represent mean $\pm$ SD absorbance at 405 nm as a measure of relative substrate degradation of three replicates for each condition and are representative of two independent experiments. Statistically significant binding was calculated in comparison with the negative control (BSA) (**P* < 0.05).

mode in both cases, and results showed that although the reactivity of Lsa23 with F30- and F70-kDa fragments was dependent on protein concentration, equilibrium was not reached with 3 μ M of Lsa23 (Figure 9C). In contrast, the reactivity of Lsa36 with the same fragments reached the saturation level at 0.25 and 0.4 μ M of protein concentration with F70- and F30-kDa fragments, respectively (Figure 9D).

Because F30- and F70-kDa fibronectin proteolytic fragments bind heparin, we analyzed the effect of increasing concentration of heparin (0–350 IU) on binding of Lsa36 and Lsa23 to both fragments. Our results showed that heparin inhibited the binding of Lsa36 to F30- and F70-kDa fragments in a concentration-dependent manner (Figure 9E). Binding reduction was statistically significant (*P* < 0.05) with 35 IU of heparin for the binding of Lsa36 to F70-kDa fragment. For Lsa36 with

FIGURE 9. Binding of Lsa23 and Lsa36 of *Leptospira interrogans* with plasma fibronectin proteolytic fragments. One microgram of proteolytic fragments F70, F45, and F30 were coated onto microtiter plates followed by incubation with 1 μ g of (A) Lsa23 or (B) Lsa36. Fetuin was used as negative control for nonspecific binding. Bars represent the mean $\pm$ SD absorbance at 492 nm of three replicates for each protein and are representative of two independent experiments; the attachment of recombinant proteins to proteolytic fragments was compared with its binding to fetuin by two-tailed *t*-test ($*P < 0.005$). C and D, dose-dependent binding experiments of Lsa23 and Lsa36, respectively, with F70 and F30; each experiment was performed in triplicate and results expressed as the mean $\pm$ SD absorbance 492 nm for each point. Dissociation constants are shown in Table 2. E, Inhibition of Lsa36 interaction with F70 and F30 by heparin. Attachment of Lsa36 (1 μ g) to fixed F70 and F30 concentration was performed in the presence of increasing amounts of heparin (0–350 IU). Attachment of Lsa36 in the presence of heparin was compared with its binding to each proteolytic fragments without heparin (0 IU) by two-tailed *t*-test ($*P < 0.05$).

the F30-kDa fragment, reduction was achieved with 70 IU of heparin. No competition was observed for Lsa23.

DISCUSSION

Whole genome sequencing of a pathogen provides access to its full antigenic collection. Genomics has catalyzed a shift in vaccine development towards sequence-based reverse vaccinology approaches that use *in silico* screening of the entire genome to identify genes that encode proteins with the features of antigen targets.⁴² Furthermore, this process has led to iden-

tification of several new virulence factors in important pathogens, such as the factor H binding protein of *Neisseria meningitidis*,⁴³ and several putative transcriptional regulators of *Streptococcus pneumoniae*.⁴⁴ We have investigated the genome sequences of *L. interrogans* serovar Copenhageni and have identified several proteins that are potentially involved in pathogenesis. We have used the criterion of cellular location and selected the proteins that are probably surface exposed.

In these studies, we selected three predicted membrane proteins of the *Leptospira* (annotated as *Leptospira* conserved hypothetical protein, probable lipoprotein, and outer

membrane protein for LIC11009, LIC11360 and LIC11975, respectively), with no assigned function (<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/leptospira/>). Bioinformatics analysis of CDSs LIC11009, LIC11360, and LIC11975 showed that these sequences are diverse and show a high percentage of identity among pathogenic strains of *Leptospira*. However, only Lsa26 (LIC11009) was detected in protein extracts of serovars of *L. interrogans* by Western blotting. This finding could be explained by the fact that 2,566 copies/cell of this protein were estimated by quantitative proteomics, but Lsa23 and Lsa36, although identified, have their number of copies below the detection limit,³⁸ indicating their low level of protein expression in leptospires. The differential expression of proteins during infection was also shown by the reactivity with serum samples from an infected host, in which the highest number of responders was detected with Lsa26.

The interaction of pathogens with ECM has been well documented,⁴⁵ and our group has reported the attachment of *L. interrogans* to several ECM components.^{8–18} Several laminin-binding proteins were identified, which indicated that leptospires have a redundant repertoire of adhesion molecules that are probably part of their invasion strategies. Lsa23, Lsa26, and Lsa36 bind laminin in a dose-dependent, specific, and saturable manner, fulfilling the properties of receptor-ligand interaction. The high affinity of Lsa23 to laminin ($K_D = 25.08 \pm 4.1$ nM), a value of the same order of magnitude as a described Lsa66 adhesin.¹⁵ The K_D values of Lsa26 and Lsa36 are similar to the ones described for LenB,⁴⁶ TlyC,⁴⁷ OmpL37,⁴⁸ Lsa20,¹⁶ Lsa33, and Lsa25¹⁷ and Lsa30¹⁸ with the same ligand.

PLG acquisition and PLA generation has been reported for several pathogens, including the spirochetes *Borrelia* spp. and *Treponema denticola* with possible implications for pathogenesis.^{41,49–52} PLA is a serine protease that can degrade a large spectrum of substrates, including fibrin clots, connective tissue, and components of extracellular matrices.^{53,54} Human PLG/PLA proteolytic activity was first described for *Leptospira* spp. by our group,¹⁹ Verma and others⁵⁵ have shown that the protein LenA of *L. interrogans* is a surface receptor for human PLG. Furthermore, several PLG-binding proteins of *Leptospira* have been identified.^{8,15–18,20,40}

We report Lsa23, Lsa26, and Lsa36 as novel PLG-binding proteins that are capable of generating PLA by addition of uPA-type PLG activator and show specific proteolytic activity. These three proteins of *Leptospira*, in addition to binding ECM and a possible role in adherence, may also help the bacteria to overcome initial physical barriers of the hosts by PLA generation. Lsa23 and Lsa36 are plasma fibronectin-interacting proteins, more specifically with the F30-kDa proteolytic fragment of fibronectin. This fragment is known to bind to heparin, and as expected, addition of increasing amounts of heparin decreased binding of Lsa36 to F30-kDa fragment, confirming that F30-kDa heparin-binding domain of fibronectin is involved in this interaction.

Pathogens have evolved strategies to escape clearance by complement, either by sequestering host-complement regulators or by down-regulating complement activation.^{56,57} Factor H is a host fluid-phase regulator of the alternative complement pathway, and C4b-binding protein controls the complement classical pathway by interfering with formation and regeneration of C3 convertase and acting as a cofactor to the serine proteinase factor I in the proteolytic inactivation of

C4b.^{57,58} Filamentous haemagglutinin of *Bordetella pertussis*, porin molecules (Por 1A and Por 1B) of *Neisseria gonorrhoeae* and Ig-binding proteins of *Streptococcus pyogenes* are example of proteins binding complement regulators.^{59–61} Pathogenic leptospiral complement-resistant strains were found to bind factor H from human serum, and this interaction seems to be associated with their serum resistance.⁶² Leptospiral binding proteins to C4BP, factor H, and factor H have been identified in *Leptospira*.^{17,18,46,63–66} We report that Lsa23 is a novel C4BP and factor H binding protein of *Leptospira*, although with the ligand affinity for factor H binding protein seems to be low.

We report characterization of three leptospiral proteins selected from genome sequences of *L. interrogans* serovar Copenhageni annotated as hypothetical proteins and predicted to be located in the bacterial membrane. Recombinant proteins Lsa23, Lsa26, and Lsa36 are laminin- and PLG-binding proteins that might be involved in attachment and host tissue penetration. Lsa23 and Lsa36 interact with fibronectin and involve the F30-kDa heparin-binding domain. Moreover, Lsa23 can bind the complement regulators C4bp and, to a lesser extent, factor H, a feature that suggests a possible contribution in the immune evasion of leptospires. Accordingly, Lsa23 is a novel multifunctional protein that might have several tasks in leptospiral pathogenesis. To date, Lsa23 is the first described laminin-, fibronectin-, PLG-, factor H and C4bp – leptospiral-binding protein.

Received April 19, 2013. Accepted for publication July 18, 2013.

Published online August 19, 2013.

Financial support: This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and Fundação Butantan, Brazil. Gabriela H. Siqueira and Marina V. Atzingen were supported by scholarships from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Authors' addresses: Gabriela H. Siqueira, Marina V. Atzingen, Ivy J. Alves, and Ana L. T. O. Nascimento, Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900, São Paulo, SP, Brazil, e Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil, E-mails: gabihase@usp.br, marina.atzingen@gmail.com, ivyvalves@butantan.gov.br, and ana.nascimento@butantan.gov.br. Zenaide M. de Moraes and Silvio A. Vasconcellos, Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, 05508-270, São Paulo, SP, Brazil, E-mails: zenaide@usp.br and savasco@usp.br.

REFERENCES

- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM, 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757–771.
- de la Pena-Moctezuma A, Bulach DM, Adler B, 2001. Genetic differences among the LPS biosynthetic loci of serovars of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 31: 73–81.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P, 1999. *Leptospira and Leptospirosis*. Melbourne, Australia: MediSci Press.
- Nakai K, Kanehisa M, 1991. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* 11: 95–110.
- Juncker AS, Willenbrock H, Von Heijne G, Brunak S, Nielsen H, Krogh A, 2003. Prediction of lipoprotein signal peptides in gram-negative bacteria. *Protein Sci* 12: 1652–1662.

6. Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MV, Oliveira MC, Menck CF, Leite LC, Carrer H, Coutinho LL, Degraive WM, Dellagostin OA, El-Dorry H, Ferro ES, Ferro MI, Furlan LR, Gamberini M, Gigliotti EA, Goes-Neto A, Goldman GH, Goldman MH, Harakava R, Jeronimo SM, Junqueira-de-Azevedo IL, Kimura ET, Kuramae EE, Lemos EG, Lemos MV, Marino CL, Nunes LR, de Oliveira RC, Pereira GG, Reis MS, Schrieffer A, Siqueira WJ, Sommer P, Tsai SM, Simpson AJ, Ferro JA, Camargo LE, Kitajima JP, Setubal JC, Van Sluys MA, 2004. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol* 186: 2164–2172.
7. Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Digiampietri LA, Harstkeerl RA, Ho PL, Marques MV, Oliveira MC, Setubal JC, Haake DA, Martins EA, 2004. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz J Med Biol Res* 37: 459–477.
8. Fernandes LG, Vieira ML, Kirchgatter K, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Romero EC, Nascimento AL, 2012. OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. *Infect Immun* 80: 3679–3692.
9. Atzingen MV, Gomez RM, Schattner M, Pretre G, Goncalves AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL, 2009. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. *J Infect* 59: 264–276.
10. Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, Atzingen MV, Watanabe MM, Vieira ML, Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL, 2006. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infect Immun* 74: 6356–6364.
11. Atzingen MV, Barbosa AS, De Brito T, Vasconcellos SA, de Moraes ZM, Lima DM, Abreu PA, Nascimento AL, 2008. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC Microbiol* 8: 70.
12. Longhi MT, Oliveira TR, Romero EC, Goncalves AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL, 2009. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. *J Med Microbiol* 58: 1275–1282.
13. Vieira ML, de Moraes ZM, Goncalves AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL, 2010. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. *J Infect* 60: 52–64.
14. Oliveira TR, Longhi MT, Goncalves AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL, 2010. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. *Microbes Infect* 12: 207–217.
15. Oliveira R, de Moraes ZM, Goncalves AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL, 2011. Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PLoS ONE* 6: e21962.
16. Mendes RS, Von Atzingen M, de Moraes ZM, Goncalves AP, Serrano SM, Asega AF, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL, 2011. The novel leptospiral surface adhesin Lsa20 binds laminin and human plasminogen and is probably expressed during infection. *Infect Immun* 79: 4657–4667.
17. Domingos RF, Vieira ML, Romero EC, Goncalves AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL, 2012. Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions. *BMC Microbiol* 12: 50.
18. Souza NM, Vieira ML, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL, 2012. Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. *Microb Pathog* 53: 125–134.
19. Vieira ML, Vasconcellos SA, Goncalves AP, de Moraes ZM, Nascimento AL, 2009. Plasminogen acquisition and activation at the surface of *Leptospira* species lead to fibronectin degradation. *Infect Immun* 77: 4092–4101.
20. Vieira ML, Atzingen MV, Oliveira TR, Oliveira R, Andrade DM, Vasconcellos SA, Nascimento AL, 2010. *In vitro* identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. *PLoS ONE* 5: e11259.
21. Turner LH, 1970. Leptospirosis. 3. Maintenance, isolation and demonstration of leptospires. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 64: 623–646.
22. Yu CS, Lin CJ, Hwang JK, 2004. Predicting subcellular localization of proteins for gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci* 13: 1402–1406.
23. Letunic I, Copley RR, Pils B, Pinkert S, Schultz J, Bork P, 2006. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res* 34: D257–D260.
24. Finn RD, Mistry J, Schuster-Bockler B, Griffiths-Jones S, Hollich V, Lassmann T, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Durbin R, Eddy SR, Sonnhammer EL, Bateman A, 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* 34: D247–D251.
25. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S, 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340: 783–795.
26. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
27. Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Tasneem A, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Bryant SH, 2009. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* 37: D205–D210.
28. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
29. Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL, 2004. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res* 37: 1103–1109.
30. Bhandari P, Gowrishankar J, 1997. An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *J Bacteriol* 179: 4403–4406.
31. Louis-Jeune C, Andrade-Navarro MA, Perez-Iratxeta C, 2012. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins* 80: 374–381.
32. Oliveira TR, Longhi MT, de Moraes ZM, Romero EC, Blanco RM, Kirchgatter K, Vasconcellos SA, Nascimento AL, 2008. Evaluation of leptospiral recombinant antigens MPL17 and MPL21 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1715–1722.
33. Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, Ferreira AG, Riley LW, Reis MG, Haake DA, Ko AI, 2001. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 39: 3303–3310.
34. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA, 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 68: 2276–2285.
35. Stamm LV, Gherardini FC, Parrish EA, Moomaw CR, 1991. Heat shock response of spirochetes. *Infect Immun* 59: 1572–1575.
36. Lin YP, Lee DW, McDonough SP, Nicholson LK, Sharma Y, Chang YF, 2009. Repeated domains of *Leptospira* immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. *J Biol Chem* 284: 19380–19391.
37. Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schaffer AA, Yu YK, 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J* 272: 5101–5109.
38. Malmstrom J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebersold R, 2009. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature* 460: 762–765.
39. Pinne M, Haake DA, 2009. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. *PLoS ONE* 4: e6071.
40. Vieira ML, Atzingen MV, Oliveira R, Mendes RS, Domingos RF, Vasconcellos SA, Nascimento AL, 2012. Plasminogen binding proteins and plasmin generation on the surface of *Leptospira* spp.: the contribution to the bacteria-host interactions. *J Biomed Biotechnol*. doi:10.1155/2012/758513. Epub 2012 Oct 15.

41. Lahteenmaki K, Kuusela P, Korhonen TK, 2001. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev* 25: 531–552.
42. Seib KL, Zhao X, Rappuoli R, 2012. Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. *Clin Microbiol Infect* 18 (Suppl 5): 109–116.
43. Schneider MC, Exley RM, Chan H, Feavers I, Kang YH, Sim RB, Tang CM, 2006. Functional significance of factor H binding to *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* 176: 7566–7575.
44. Hava DL, Camilli A, 2002. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* 45: 1389–1406.
45. Ljungh A, Wadstrom T, 1996. Interactions of bacterial adhesins with the extracellular matrix. *Adv Exp Med Biol* 408: 129–140.
46. Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Miller MC, Demoll E, Kraiczy P, Cooley AE, Creamer TP, Suchard MA, Brissette CA, Verma A, Haake DA, 2007. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS ONE* 2: e1188.
47. Carvalho E, Barbosa AS, Gomez RM, Cianciarullo AM, Hauk P, Abreu PA, Fiorini LC, Oliveira ML, Romero EC, Goncalves AP, Morais ZM, Vasconcellos SA, Ho PL, 2009. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. *FEBS Lett*.
48. Pinne M, Choy HA, Haake DA, 2010. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e815.
49. Coleman JL, Benach JL, 1999. Use of the plasminogen activation system by microorganisms. *J Lab Clin Med* 134: 567–576.
50. Coleman JL, Benach JL, 2000. The generation of enzymatically active plasmin on the surface of spirochetes. *Methods* 21: 133–141.
51. Nordstrand A, Shamaei-Tousi A, Ny A, Bergstrom S, 2001. Delayed invasion of the kidney and brain by *Borrelia crocidurae* in plasminogen-deficient mice. *Infect Immun* 69: 5832–5839.
52. Haile WB, Coleman JL, Benach JL, 2006. Reciprocal upregulation of urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-2, by *Borrelia burgdorferi* affects bacterial penetration and host-inflammatory response. *Cell Microbiol* 8: 1349–1360.
53. Ponting CP, Marshall JM, Cederholm-Williams SA, 1992. Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul Fibrinolysis* 3: 605–614.
54. Angles-Cano E, Rouy D, Lijnen HR, 1992. Plasminogen binding by alpha 2-antiplasmin and histidine-rich glycoprotein does not inhibit plasminogen activation at the surface of fibrin. *Biochim Biophys Acta* 1156: 34–42.
55. Verma A, Brissette CA, Bowman AA, Shah ST, Zipfel PF, Stevenson B, 2010. Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infect Immun* 78: 2053–2059.
56. Lindahl G, Sjobring U, Johnsson E, 2000. Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms. *Curr Opin Immunol* 12: 44–51.
57. Blom AM, 2002. Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein. *Biochem Soc Trans* 30: 978–982.
58. Gigli I, Fujita T, Nussenzweig V, 1979. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 6596–6600.
59. Berggard K, Johnsson E, Mooi FR, Lindahl G, 1997. *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin. *Infect Immun* 65: 3638–3643.
60. Ram S, Cullinane M, Blom AM, Gulati S, McQuillen DP, Monks BG, O'Connell C, Boden R, Elkins C, Pangburn MK, Dahlback B, Rice PA, 2001. Binding of C4b-binding protein to porin: a molecular mechanism of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* 193: 281–295.
61. Thern A, Stenberg L, Dahlback B, Lindahl G, 1995. Ig-binding surface proteins of *Streptococcus pyogenes* also bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system. *J Immunol* 154: 375–386.
62. Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M, 2005. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. *Microb Pathog* 39: 139–147.
63. Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB, Monaris D, Abreu PA, Strobel S, Jozsi M, Isaac L, Barbosa AS, 2012. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *J Infect Dis* 205: 995–1004.
64. Barbosa AS, Monaris D, Silva LB, Morais ZM, Vasconcellos SA, Cianciarullo AM, Isaac L, Abreu PA, 2012. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. *Infect Immun* 78: 3207–3216.
65. Verma A, Hellwage J, Artiushin S, Zipfel PF, Kraiczy P, Timoney JF, Stevenson B, 2006. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 74: 2659–2666.
66. Choy HA, 2012. Multiple activities of LigB potentiate virulence of *Leptospira interrogans*: inhibition of alternative and classical pathways of complement. *PLoS ONE* 7: e41566.

Adhesins of *Leptospira interrogans* Mediate the Interaction to Fibrinogen and Inhibit Fibrin Clot Formation *In Vitro*

Rosane Oliveira^{1,2}, Renan F. Domingos^{1,2}, Gabriela H. Siqueira^{1,2}, Luis G. Fernandes^{1,2}, Natalie M. Souza^{1,2}, Monica L. Vieira¹, Zenaide M. de Moraes³, Silvio A. Vasconcellos³, Ana L. T. O. Nascimento^{1,2*}

1 Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Programa Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

We report in this work that *Leptospira* strains, virulent *L. interrogans* serovar Copenhageni, attenuated *L. interrogans* serovar Copenhageni and saprophytic *L. biflexa* serovar Patoc are capable of binding fibrinogen (Fg). The interaction of leptospires with Fg inhibits thrombin- induced fibrin clot formation that may affect the haemostatic equilibrium. Additionally, we show that plasminogen (PLG)/plasmin (PLA) generation on the surface of *Leptospira* causes degradation of human Fg. The data suggest that PLA-coated leptospires were capable to employ their proteolytic activity to decrease one substrate of the coagulation cascade. We also present six leptospiral adhesins and PLG- interacting proteins, rLIC12238, Lsa33, Lsa30, OmpL1, rLIC11360 and rLIC11975, as novel Fg-binding proteins. The recombinant proteins interact with Fg in a dose-dependent and saturable fashion when increasing protein concentration was set to react to a fix human Fg concentration. The calculated dissociation equilibrium constants (K_D) of these reactions ranged from 733.3 ± 276.8 to 128 ± 89.9 nM for rLIC12238 and Lsa33, respectively. The interaction of recombinant proteins with human Fg resulted in inhibition of fibrin clot by thrombin-catalyzed reaction, suggesting that these versatile proteins could mediate Fg interaction in *Leptospira*. Our data reveal for the first time the inhibition of fibrin clot by *Leptospira* spp. and presents adhesins that could mediate these interactions. Decreasing fibrin clot would cause an imbalance of the coagulation cascade that may facilitate bleeding and help bacteria dissemination

Citation: Oliveira R, Domingos RF, Siqueira GH, Fernandes LG, Souza NM, et al. (2013) Adhesins of *Leptospira interrogans* Mediate the Interaction to Fibrinogen and Inhibit Fibrin Clot Formation *In Vitro*. PLoS Negl Trop Dis 7(8): e2396. doi:10.1371/journal.pntd.0002396

Editor: Joseph M. Vinetz, University of California San Diego School of Medicine, United States of America

Received: March 22, 2013; **Accepted:** July 19, 2013; **Published:** August 29, 2013

Copyright: © 2013 Oliveira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by FAPESP (www.fapesp.br, grant 10/52579-4), CNPq (www.cnpq.br) and Fundacao Butantan, Brazil (www.butantan.gov.br/home/fundacao_butantan.php). RO, RFD, GHS, NMS, LGF and MLV have scholarships from FAPESP (Brazil). The funders, FAPESP, CNPq and Fundacao Butantan, had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: tabet@butantan.gov.br.

Introduction

The spirochete *Leptospira interrogans* is a highly invasive pathogen and the causal agent of leptospirosis, one of the most widespread zoonosis of human and veterinary concern [1,2]. The transmission occurs through contact with environmental water contaminated by leptospires shed in the urine of animal carriers [1,3]. Humans are accidental and terminal hosts in the transmission process of leptospirosis. The leptospires enter the body via abrasions on skin or actively through mucosa, spreading to any tissue, and colonizing target organs [4,3]. *Leptospira* can cause damage of the endothelium of small blood vessels, leading to hemorrhage and localized ischemia in multiple organs. As a consequence, renal tubular necrosis, hepatocellular damage and development of leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome (LPHS) may occur in the host [1,5,6]. The mechanisms responsible for bleeding in leptospirosis are poorly understood. Hemolysins could play an important role in this toxic response and several genes coding for predicted hemolysins were identified in the genome

sequencing *L. interrogans* [7]. Yet, when evaluated, these proteins failed to show hemolytic activity in human erythrocytes [8,9].

Fg and PLG are key proteins in the coagulation cascade and fibrinolysis, respectively, and critical determinants of bacterial virulence and host defense [10]. Fg is the major clotting protein present in blood plasma with an important role in blood coagulation and thrombosis. PLG under the action of its activators generates PLA, a serine-protease capable of degrading ECM components, fibrin, facilitating the pathogen penetration and invasion [11].

We have previously shown that PLA-associated *Leptospira* renders the bacteria with proteolytic activity capable of degrading ECM components [12] that in turn, may help bacterial penetration and dissemination. Furthermore, PLA-coated leptospires have also shown to degrade IgG and C3b that could facilitate the bacterial immune evasion [13]. The adhesion of physiological osmotically induced *Leptospira* with Fg was described but their effect on fibrin formation was not ascertained [14]. The leptospiral proteins LigB and OmpL37 were shown to interact

Author Summary

Leptospirosis is probably the most widespread zoonosis in the world. Caused by spirochaetes of the genus *Leptospira*, it has greater incidence in tropical and subtropical regions. The disease has become prevalent in cities with sanitation problems and a large population of urban rodent reservoirs, which contaminate the environment through their urine. Understanding the mechanisms involved in pathogenesis of leptospirosis should contribute to new strategies that would help fight the disease. We show in this work that *Leptospira* strains, virulent, attenuated or saprophytic are capable of binding fibrinogen (Fg). The interaction of leptospires with Fg inhibits the formation of fibrin clot that may result of an imbalance in the haemostatic equilibrium. In addition, we show that plasminogen (PLG)/plasmin (PLA) generation on the surface of leptospires can lead to Fg degradation, showing evidence of possible route of fibrinolysis in leptospirosis. We also present six leptospiral proteins, as novel Fg-binding proteins, capable of inhibiting fibrin clot formation by thrombin-catalyzed reaction, suggesting that in *Leptospira* these multifunctional proteins could mediate Fg interaction. Our data suggest possible mechanisms that leptospires could employ to affect the coagulation cascade and fibrinolytic system that might lead to bacteria spreading.

with Fg and LigB was reported to reduce fibrin clot formation [15,16,17].

We thus decided to evaluate if Fg-associated *Leptospira* was capable to inhibit the fibrin clot formation and the ability of seven recombinant proteins to act as leptospiral Fg-receptors. We report that *Leptospira* strains and the recombinant ECM- and PLG-interacting proteins, rLIC12238 [18], Lsa33, Lsa25 [19], Lsa30 [20], OmpL1 [21], rLIC11360 and rLIC11975 [22], are capable to adhere to Fg. We also show that this interaction inhibits fibrin clot formation by thrombin-catalyzed reaction. Moreover, PLA-coated *Leptospira* was capable to degrade Fg. Altogether, the results suggest possible pathways that *Leptospira* may interfere with the coagulation/bleeding process.

Methods

Ethics statement

All animal studies were approved by the Ethical Committee for Animal Research of Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil under protocol n° 798/11. The Committee in Animal Research in Instituto Butantan adopts the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation.

Leptospira strains and culture conditions

The non-pathogenic *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc 1, the pathogenic attenuated *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20 and the virulent strains of *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Pomona Fromm (LPF) and serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 were cultured at 28°C under aerobic conditions in liquid EMJH medium (Difco) with 10% rabbit serum, enriched with L-asparagine (wt/vol: 0.015%), sodium pyruvate (wt/vol: 0.001%), calcium chloride (wt/vol: 0.001%), magnesium chloride (wt/vol: 0.001%), peptone (wt/vol: 0.03%) and meat extract (wt/vol: 0.02%) [23]. *Leptospira* cultures are maintained in Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, SP, Brazil. Unless otherwise stated, experiments were performed with leptospires resuspended in low salt – lsPBS (50 mM), instead of

PBS that contains 137 mM NaCl, because it is an osmolarity condition closer to cultivation, which is approximately 35 mM.

Immunofluorescence assay

For the immunofluorescence assay (IFA), live *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20 suspensions ($\sim 10^8$) were harvested at $5,000 \times g$ for 15 min, washed three times with lsPBS, resuspended in 200 μ L lsPBS, and fixed with 200 μ L with 4% paraformaldehyde for 40 min at 30°C. After the fixation, propidium iodide (Sigma) diluted 1:50 in lsPBS was added to stain the nuclei, and the suspensions were incubated for 45 min at 30°C. After this time, the leptospires were gently washed three times with lsPBS and blocked with lsPBS containing 5% BSA for 90 min at 30°C, followed by incubation with 16 μ g Fg in 200 μ L lsPBS for 60 min at 37°C. The leptospires were washed three times with lsPBS plus 1% BSA and incubated with goat-produced antiserum against human Fg at a 1:50 dilution for 45 min at 37°C. Leptospires were washed three times again and incubated with rabbit anti-goat IgG antibodies conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC; Sigma) at a dilution of 1:400 for 45 min at 37°C. After this incubation, the leptospires were washed twice with lsPBS containing 1% BSA and once with distilled water. Finally they were resuspended in lsPBS-antifading solution (ProLong Gold; Molecular Probes). The immunofluorescence-labeled leptospires were examined by use of a confocal LSM 510 META immunofluorescence microscope (Zeiss, Germany). As a control for unspecific binding, Fg was absent from the reaction mixtures.

Binding of soluble human Fg to *Leptospira*

For accessing the leptospiral binding to soluble human Fg, ELISA plates were coated with 10^8 leptospires in lsPBS per well (*L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130, *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20, and *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc 1), allowed to set for 3 h at 37°C and then blocked with 200 μ L of phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween (PBS-T) with 10% non-fat dry milk. After 2 h incubation, plates were washed with PBS-T and then 100 μ L of a Fg solution (Fg- Sigma) (10 μ g/mL in lsPBS) were added per well and incubation proceeded for 2 h. After extensive washing, 100 μ L of solution containing goat anti-Fg (1:25,000 in lsPBS) were added per well and incubation was carried out for 1 h at 37°C. After three washings, 100 μ L of solution containing peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-goat IgG (1:50,000 in lsPBS) were added per well and the reaction continued for 1 h at 37°C. The wells were washed three times, and *o*-phenylenediamine (OPD) (1 mg/mL) in citrate phosphate buffer (pH 5.0) plus 1 μ L/mL H_2O_2 was added (100 μ L per well). The reaction was allowed to proceed for 10 min and interrupted by the addition of 50 μ L of 8 M H_2SO_4 . Readings were taken at 492 nm in a microplate reader (Multiskan EX; Thermo Fisher Scientific, Helsinki, Finland). The binding of Fg to each leptospiral strain was performed in triplicate and a negative control in which Fg was omitted was included in the experiment. In the no-cell control, BSA replaced leptospires. For statistical analyses, the binding of Fg to different strains and control BSA was performed using one-way ANOVA, followed by Tukey post-test for pairwise comparisons.

Effect of Fg-bound leptospires on fibrin clot formation

Live leptospires (*L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130, *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20, and *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc 1), 10^9 , 10^7 , 10^5 cells/mL were harvested at $5,000 \times g$ for 20 min at room temperature, washed once with lsPBS, resuspended in 0.5 mL of lsPBS plus 1 mg/mL of Fg (Sigma), and incubated for 2 h at 37°C. ELISA

plates were placed with 90 μ L/well of leptospires plus Fg and 10 μ L/well of thrombin (10 U/mL - Sigma). The fibrin clot formation was measured every 1 min for 10 min and then every 5 min for 35 min by an ELISA plate reader (Multiskan EX Thermo Fisher Scientific) at OD595_{nm}. The positive control of the reaction employed Fg (1 mg/mL) plus thrombin (10 U/mL) while in the negative control thrombin was omitted. For statistical analyses, inhibition of fibrin clot formation was performed by one-way ANOVA, followed by Tukey post-test for pairwise comparisons. Three independent experiments were performed.

Human Fg degradation by leptospires coated with PLA

Virulent *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Pomona Fromm (10⁸ leptospires/sample) were treated in 200 μ L lPBBS with the addition of: (a) 10 μ g PLG (b) 3U urokinase (uPA) (c) 10 μ g PLG and 3U uPA (generating PLA-coated leptospires) or (d) only lPBBS with no additions (untreated). The bacteria were incubated for 1 h at 37°C with the PLG, and for one more hour after the addition of uPA. The cells were washed three times with lPBBS to remove the free PLG, uPA and PLA. Then, the bacteria were resuspended in 100 μ L lPBBS containing goat anti-human Fg human purified Fg (Sigma, USA) as substrate, and incubated for 16 h at 37°C. Three additional controls were employed: (a) one sample received 1 μ g of the protease inhibitor aprotinin (Sigma, USA) to the Fg-leptospires incubation, (b) one sample contained only Fg without leptospires, and (c) one sample received the PLG and uPA treatment without the addition of leptospires to rule out the free PLA Fg degradation. The leptospires were removed by centrifugation, 20 μ L of the supernatants were separated by 8% SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membranes in semi-dry equipment. The membranes were blocked by incubating overnight at 4°C with 5% non-fat dry milk and 1% BSA. The Fg detection was performed by incubations with goat anti-human Fg antibodies and rabbit anti-goat secondary antibodies conjugated with HRP, followed by ECL (GE Healthcare) development.

In another assay, after the incubation for Fg degradation, the pelleted leptospires and the remaining cell-free supernatants were also evaluated for the presence of Fg by ELISA. The cells were resuspended in 100 μ L lPBBS and coated onto ELISA plates overnight at 4°C, as well as the cell-free supernatants previously diluted 20 times. The plates were washed three times with PBS-T and blocked with solution containing 5% BSA and 5% non-fat dry milk for 2 h at 37°C, following incubations with anti-Fg polyclonal antibodies (1:25,000) and secondary antibodies conjugated to peroxidase (1:50,000). The reactions were developed by addition of 100 μ L/well of solution containing 1 mg/mL OPD and 1 μ L/mL H₂O₂, and stopped by addition of 50 μ L/well H₂SO₄. The samples in which the leptospires received no treatment (only PBS) were considered as having 100% of Fg for comparative purposes.

Bioinformatics characterization of the proteins

Predicted coding sequences (CDSs) were analyzed for their cellular localization by PSORT program, <http://psort.nibb.ac.jp> [24,25]. The web servers SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de/> [26,27], PFAM, <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/> [28], and LipoP, <http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/> [29] were used to search for predicted functional and structural domains within the amino acid sequences of the CDSs.

Cloning, expression and purification of recombinant proteins

Amplification of the CDSs was performed by PCR from *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20 genomic DNA using

complementary primer pairs (Table 1). The gene sequences were amplified without the signal peptide tag and cloned into pAE expression vector [30]. The final constructs were verified by DNA sequencing on an ABI Prism 3730_L sequencer (Seq- Wright, Houston, TX) with appropriate vector-specific T7 (F: TAATAC-GACTCACTATAGGG) and pAE (R:CAGCAGCCAACT-CAGTTCCT) primers. Detailed of cloning, expression and purification of the recombinant proteins Lsa33, Lsa25, rLIC12238, Lsa30, OmpL1, rLIC11360 and rLIC11975 has been previously described [18,19,21,20,22]. The proteins rLIC11360 and Lsa30 were kept at pH 12 required for their solubility.

Antiserum

Five female BALB/c mice (4–6 weeks old) were immunized subcutaneously with 10 μ g of each recombinant protein adsorbed in 10% (vol/vol) of Alhydrogel (2% Al(OH)₃, Brenntag Biosector, Denmark), used as adjuvant. Two subsequent booster injections were given at 2-week intervals with the same recombinant proteins preparation. Negative - control mice were injected with PBS plus Alhydrogel. Two weeks after each immunization, the mice were bled from the retro - orbital plexus and the pooled sera were analyzed by ELISA for determination of antibody titers.

Fg binding assay and dose-response curves

The binding of the recombinant proteins to Fg was evaluated by a modified ELISA, as follows: 96-well plates (Costar High Binding, Corning) were coated overnight in PBS at 4°C with 100 μ L of 10 μ g/mL of the human Fg (Sigma); LigB7-12 protein of *L. interrogans*, known as having Fg-binding domain [31,17], generous donation from Dr. Odir Dellagostin, UFPEL, RS, Brazil, was employed as a positive control. PspA, an outer membrane protein of *Streptococcus pneumoniae* [32], kind gift from Dr. Luciana Leite, Instituto Butantan, SP, Brazil, was employed as an unrelated negative control protein. Gelatin (Difco) was also employed as negative protein control. Plates were washed three times with PBS-T and blocked for 2 h at 37°C with PBS with 10% (wt/vol) non-fat dry milk. The blocking solution was discarded and 100 μ L of 10 μ g/mL recombinant proteins in PBS was incubated for 2 h at 37°C. Wells were washed three times with PBS-T and incubated for 1 h at 37°C with polyclonal mouse antiserum produced against each recombinant protein. The serum dilution used was determined by titration curve with the corresponding recombinant protein and the value of 1.0 at OD492_{nm} was employed. These values are: 1:1,000 for rLIC12238; 1:750 for Lsa33; 1:500 for rLIC11975 and rLIC11360; 1:400 for Lsa30, 1:800 for OmpL1, 1:500 for Lsa25 and 1:200 for PspA. After incubation, plates were washed again and incubated with HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulin G (IgG), diluted 1:5,000 in PBS. After three washings, 100 μ L/well of 1 mg/mL OPD plus 1 μ L/mL H₂O₂ in citrate phosphate buffer (pH 5.0) were added. The reactions were carried out for 15 min and stopped by the addition of 50 μ L/well of H₂SO₄ (8 M). Readings were taken at OD492_{nm}. In another assay, the assessment of bound proteins was performed by incubation for 1 h at 37°C with monoclonal anti-polyhistidine-HRP (Sigma) at appropriate dilutions: 1:5,000 for rLIC12238; 1:10,000 for rLIC11975 and rLIC11360; 1:1,000 for Lsa30; 1:500 for Lsa33, 1:400 for OmpL1, 1:200 for Lsa25 and 1:200 for LigB7-12. The reaction was developed with 1 mg/mL OPD plus 1 μ L/mL H₂O₂, as described above. The rate of interaction of recombinant proteins to Fg was determined by measuring the reaction as a function of time. The OD492_{nm} value after 2 h interaction was considered the maximal binding (100%) and was used for statistical analyses, using Student's two-tailed t test. For

Table 1. Gene locus, protein name, gene bank reference sequence, protein conservation, sequence of the primers employed for DNA amplification, and molecular mass of expressed recombinant proteins.

Gene locus ¹	Given name	NCBI reference sequence number ²	Description/ function	Conservation (identity) ³	Sequence of primers for PCR amplification	Recombinant protein molecular mass
LIC11834	Lsa33 ^a	YP_001783.1	Putative lipoprotein	Lai (99%) LBH (87%) LSS (88%) LlicsVM (60%) LBP (31%)	F: 5' <u>CTCGAGGATCTACAAGGTGGGGTTT</u> TTAC3' (XhoI) R: 5' <u>CCATGGTTACTGAGGTTTACTTGG</u> TCC3' (NcoI)	33.10 kDa
LIC11975	Lsa36 ^b	YP_0019141	Outer membrane protein	Lai (99%) LBH (0%) LSS (0%) LlicsVM (54%) LBP (38%)	F: 5' <u>CTCGAGGAATGTAGCGGTGCGG3'</u> (XhoI) R: 5' <u>AAGCTTTCATCCCAAAGATAA</u> T TCA3' (HindIII)	36.12 kDa
LIC10973	OmpL1 ^c	YP_000947.1	Outer membrane Protein	Lai (94%) LBH (87%) LSS (87%) LlicsVM (51%) LBP (44%)	F: 5' <u>GGATCCAAAACATATGCAATTGTA</u> GG3' (BamHI) R: 5' <u>GGTACCTTAGAGTTCGTGTTTATA</u> ACC3' (KpnI)	32.40 kDa
LIC11360	Lsa23 ^b	YP_0013241	Putative lipoprotein	Lai (99%) LBH (69%) LSS (67%) LlicsVM (44%) LBP (0%)	F: 5' <u>GGATCCGAAGTTCCTTACTTTTCC</u> CCTAAC3' (BamHI) R: 5' <u>AAGCTTGAATGTGACTAGAGGC</u> ATTACT3' (HindIII)	22.53 kDa
LIC12238	rLIC12238 ^d	YP_002173	Hypothetical protein	Lai (99%) LBH (77%) LSS (0%) LlicsVM (50%) LBP (39%)	F: 5' <u>CTCGAGTGTTTAAACCTACCGG</u> AG3' (XhoI) R: 5' <u>AAGCTTCTACTTCATCGCTTTTTC</u> TATATC 3' (HindIII)	17.63 kDa
LIC11087	Lsa30 ^e	YP_0010571	Hypothetical protein	Lai (99%) LBH (75%) LSS (81%) LlicsVM (29%) LBP (30%)	F: 5' <u>CTCGAGGGAGATTCCAGAAAGAA</u> AAC3' (XhoI) R: 5' <u>AAGCTTACTGTGTGATGCGCTT</u> C T3' (HindIII)	30.00 kDa
LIC12253	Lsa25 ^a	YP_002188.1	Hypothetical protein	Lai (100%) LBH (77%) LSS (79%) LlicsVM (33%) LBP (39%)	F: 5' <u>CTCGAGGAGAGAAACCGGACGA</u> TAC 3' (XhoI) R: 5' <u>CCATGGTTAGGGAAGACTTCTAAC</u> ACATC 3' (NcoI)	24.07 kDa

¹<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>;²<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>;³<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi/>. This work, Lai: *L. interrogans* serovar Lai [56]; LBH: *L. borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis [57]; LBP: *L. biflexa* serovar Patoc [58]; LlicsVM: *L. licerasiae* serovar Varillal [59]; LSS: *L. santarosai* serovar Shermani [60].^aPreviously published by Domingos *et al.*, 2012 [19].^bPreviously published by Siqueira *et al.*, 2013 [22].^cPreviously published by Fernandes *et al.*, 2012 [21].^dPreviously published by Vieira *et al.*, 2010 and Oliveira *et al.*, 2011 [18,36].^ePreviously published by Souza *et al.*, 2012 [20].

doi:10.1371/journal.pntd.0002396.t001

determination of dose-response curves of the binding of recombinant proteins to human Fg, protein concentrations varying from 0 to 4,000 nM in PBS were used. Binding was detected with polyclonal antibodies against each protein at the dilution described above, except for LigB7-12 where monoclonal anti-polyhistidine-HRP was used (1:200). For statistical analyses, the binding of recombinant proteins to human Fg was compared to its binding to gelatin by Student's two-tailed t test.

Antibody inhibition assay

96-well plates were coated with 1 µg of Fg in 100 µL of PBS and allowed to set overnight at 4°C. The wells were washed three times with PBS-T and then blocked with 200 µL of 10% (wt/vol) nonfat dry milk for 2 h at 37°C. Prior to the next step, the proteins were incubated for 1 h at 37°C with the respective antibodies diluted 1:50 in 100 µL of PBS. After the incubation, each recombinant protein (1 µg) was added per well in 100 µL of PBS, and allowed to attach to Fg for 90 min at 37°C. Polyclonal serum obtained in mice against another leptospiral protein, DnaK (1:50), was employed as a control that is not specific for the studied proteins. After washing six times with PBS-T, bound recombinant proteins were detected by adding monoclonal HRP-conjugated mouse anti-polyhistidine-HRP (Sigma) at dilutions described above. Incubation proceeded for 1 h at 37°C. The detection was performed with OPD, as previously described. BSA or gelatin was used as negative control (data not shown). For statistical analyses, the attachment of blocked recombinant proteins to Fg was compared to the binding with the untreated proteins by the two-tailed t test (* $P < 0.05$).

Effect of recombinant protein denaturing on the interaction with Fg

ELISA plates were coated overnight at 4°C with 100 µL of 10 µg/mL Fg. Plates were washed three times with PBS-T and blocked with 200 µL of 10% (wt/vol) nonfat dry milk for 2 h at 37°C. The recombinant proteins were denatured by incubation at 96°C for 10 min; 1 µg of each was added per well in 100 µL of PBS. The recombinant proteins were allowed to attach to Fg at 37°C for 90 min. After washing six times with PBS-T, bound recombinant proteins were detected by incubation with mouse serum raised against the respective protein (dilutions described above) at 37°C for 1 h. After three washings with PBS-T, 100 µL of a 1:5,000 dilution of HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Sigma) in PBS was added per well for 1 h at 37°C. The detection was performed with OPD, as previously described. BSA or gelatin was used as negative control (data not shown). For statistical analyses, the attachment of denatured recombinant proteins to Fg was compared to untreated recombinants binding by the two-tailed t test (* $P < 0.05$).

Dissociation equilibrium constant (K_D) for the binding of recombinant proteins to human Fg

The ELISA data were used to calculate the dissociation equilibrium constant (K_D) according to the method previously described [33] based on the equation: $K_D = (A_{max} \cdot [protein]) / A - [protein]$, where A is the absorbance at a given protein concentration, A_{max} is the maximum absorbance for the ELISA plate reader (when the equilibrium is reached), [protein] is the protein concentration and K_D is the dissociation equilibrium constant for a given absorbance at a given protein concentration (ELISA data point).

Fibrin clot formation inhibition assay in the presence of recombinant proteins

The assay of thrombin-catalyzed fibrin clot inhibition was performed in the presence of recombinant proteins. We have

employed the concentration of recombinant proteins in which there was a binding saturation to Fg. Proteins that do not bind Fg were employed at the same concentration range. Protein concentration employed: Lsa33 – 3,000 nM, OmpL1 – 3,000 nM, rLIC12238 – 3,500 nM, rLIC11975 – 2,000 nM, LigB7-12 – 1,500 nM, Lsa25 – 3,000 nM, PspA – 3,000 nM. Recombinant proteins were resuspended in 0.5 mL of PBS plus 1 mg/mL of Fg and incubated for 2 h at 37°C. ELISA plates were coated with 90 µL/well of recombinant proteins plus Fg and 10 µL/well of thrombin (10 U/mL). The fibrin clot formation was measured as previously described. Reduction of the fibrin clot formation was calculated by comparing the value of the last reading point, at 45 min, with the positive control (100%). Analysis was performed using one-way ANOVA, followed by Tukey post-test for pairwise comparisons.

Inhibition of live leptospires binding to Fg by recombinant proteins

ELISA plates were coated with Fg (1 µg/well) in PBS and allowed to set overnight at 4°C; the wells were then washed and blocked with 10% non-fat dry milk in PBS-T for 2 h at 37°C. The blocking solution was discarded, and the wells were incubated for 90 min at 37°C with increasing concentrations of recombinant proteins (0 to 4.5 µM). After three washings, 100 µL/well of 4×10^7 live *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20 were added for 90 min at 37°C. The unbound leptospires were washed and the quantification of bound leptospires was performed indirectly by anti-LipL32 antibodies produced in mice (1:4,000), based on the fact that LipL32 is a major expressed membrane leptospiral protein [34]; the procedure was followed by the addition of HRP-conjugated anti-mouse IgG antibodies, essentially as described in Atzingen et al., (2008) [35]. The detection was performed by OPD, as above described.

Results

Binding of human Fg by *L. interrogans* cells

The ability of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20 cells to bind human Fg was performed by immunofluorescence assay (IFA). Leptospires were visualized by propidium iodide staining (Fig. 1, panel A) followed by protein detection with goat anti-human Fg, in the presence of anti-goat IgG antibodies conjugated to FITC. Green fluorescence could be observed for Fg (Fig. 1 -Fg1B, Fg2B). The localization of the protein-green light within the leptospires was achieved by superimposing both fields and the results obtained are shown in Fig. 1 - Fg1C and Fg2C. The FgØ shows the control of the reaction in which Fg was absent.

Interaction of human Fg with *Leptospira* spp. and inhibition of fibrin clot formation

We have evaluated the capability of soluble human Fg (10 µg/mL) to interact with immobilized strains of leptospires by ELISA. We performed the experiments using virulent *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130, pathogenic attenuated *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20 and one saprophytic *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc 1. The binding of Fg to each leptospiral strain was performed in triplicate and the data represent the mean $\pm$ the standard deviation from one representative experiment is depicted in Fig. 2A. The measurements were performed in the presence (Fg+) and absence (Fg-) of human Fg while in the no-cell control, BSA replaced leptospires. For statistical analyses, the attachment of Fg to leptospiral strains was performed by one-way ANOVA followed by Tukey post-test for pairwise comparison, asterisks above the bars refer to

Figure 1. Recognition of Fg binding to *Leptospira* by IFA. Live *L. interrogans* sorovar Copenhageni strain M-20 were fixed with 2% paraformaldehyde and treated with 16 μ g of Fg. The recognition was assessed through polyclonal anti-Fg antibodies under confocal immunofluorescence microscope (Fg1 and Fg2). Control in which Fg was absent from the incubation mixture is shown (Fg Ø). Panels A: DNA propidium iodide-stained, B: FITC-stained and C: A+B composite images.
doi:10.1371/journal.pntd.0002396.g001

comparison to BSA (no cell control) (** $P < 0.01$). The comparison among leptospiral strains is also shown (# $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$). The results show that all strains tested were able of binding human Fg, but the virulent strain was more efficient. We have assessed the effect of *Leptospira*-bound to Fg on the inhibition of thrombin-catalyzed fibrin clot formation. The reaction was analyzed with the same strains and readings were taken at OD_{595nm} every 1 min for the first 10 min and then every 5 min for 35 min. The complete reaction, Fg plus thrombin, was used as a positive control while in the negative one, thrombin was missing. The determination was performed in two independent experiments and a representative assay is shown in Fig. 2B. The data show that all the strains studied promoted an inhibition of fibrin formation statistically significant compared to the reaction

positive control. However, the small difference observed between the strains pathogenic and saprophyte was not statistically relevant.

PLA-associated leptospires on human Fg

The effect of PLA-coated virulent *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Pomona Fromm on human Fg was evaluated by Western blotting using anti-human Fg antibodies (Fig. 3A). The results show that PLA generation on the surface of *Leptospira* cause degradation of human Fg (Fig. 3A, lane 5), which is not observed when at least one of the reaction components is missing (Fig. 3A, lanes 1, 2, 3 and 4) and completely prevented in the presence of a serine protease inhibitor, aprotinin (Fig. 3A, lane 6). The data suggest that PLA-coated leptospires were capable to employ their

Figure 2. (A). Interaction of leptospires to Fg. The binding of soluble human Fg (10 μ g/mL) to immobilized strains of leptospires (*L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130, *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20, and *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc 1) was accessed by ELISA. After 2 h interaction, plates were washed and the detection of bound Fg was verified by incubation with goat anti-Fg (1:25,000) followed by incubation with HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG (1:50,000). The binding of Fg to each leptospiral strain was performed in triplicate and the data represent the mean $\pm$ the standard deviation from one representative experiment. Fg+ and Fg- stand for the presence and absence of Fg, respectively, while in the no-cell control, BSA replaced leptospires. For statistical analyses, the attachment of Fg to leptospiral strains was performed by one-way ANOVA followed by Tukey post-test for pairwise comparison, asterisks above the bars refer to comparison to BSA (no cell control) (** $P < 0.01$). The comparison among leptospiral strains is also shown (# $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$). **(B)** Inhibition of fibrin clot formation by leptospires. 1 mg/mL of Fg plus live leptospires, pre-incubated for 2 h at 37°C, and 10 U/mL of thrombin were placed into ELISA plates. The positive control of the reaction employed Fg (1 mg/mL) plus thrombin (10 U/mL) while in the negative control thrombin was omitted. BSA was used as a negative control of binding. The fibrin clot formation was measured every 1 min for 10 min and then every 5 min for 35 min. Each point was performed in triplicate and expressed as the mean absorbance value at 595_{nm} $\pm$ SD for each point.
doi:10.1371/journal.pntd.0002396.g002

proteolytic activity to interfere with one of the coagulation cascade substrate.

The Fg degradation by PLA-coated leptospires was also evaluated by ELISA. When leptospires were treated with PLG+uPA, the detection of Fg remaining in cell-free solution is decreased when compared to untreated, only PLG or only uPA-treated or when aprotinin was added to the Fg incubation (Fig. 3B). An additional control lacking leptospires was added in order to rule out the contribution of free PLA to the Fg degradation. As expected, the data showed that the remaining Fg level in this control was comparable with the non-proteolytic controls. Cell-bound Fg was also evaluated. PLA-coated leptospires retain Fg

binding ability, though it seems to be diminished (Fig. 3B), probably due to Fg degradation.

Selection of putative surface proteins from genome sequences

The rationale for protein selection was mostly based on cellular localization, since surface proteins are potential receptors for Fg. We have selected seven proteins, all of them previously shown to be leptospiral adhesins and were already published, rLIC12238 [18,36], Lsa33, Lsa25 [19], Lsa30 [20], OmpL1 [21], rLIC11360 and rLIC11975 [22]. Table 1 summarizes features of the selected proteins, gene locus, given name, gene conservation within the

Figure 3. Degradation of Fg by PLA-coated leptospire. (A) *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Pomona Fromm (LPF) (10^8 /sample) were treated with the addition of 10 μ g PLG (lane 3), 3U uPA (lane 4) 10 μ g PLG and 3U uPA (PLA) (lanes 5, 6) or no additions (untreated) (lane 2). Control lacking leptospire (lane1) and addition of 1 μ g aprotinin to the Fg-leptospire incubation (lane 6) were employed. The cells were incubated with 15 μ g/mL human purified Fg for 16 h at 37°C, and the supernatants were fractionated by SDS-PAGE and transferred to membranes. The Fg was detected by specific antibodies and the reaction was developed by ECL reagent. Indicated on the left are the molecular mass standards, and on the right, the masses of the intact Fg (340 kDa) and its degradation product (D domains, 90 kDa). (B) After treatments and incubation with Fg, the cell-free (supernatants) and cell-bound Fg were coated onto ELISA plates and detected by Fg polyclonal antibodies. A control lacking leptospire received the PLG+uPA treatment to rule out the contribution of contaminating cell-free PLA to Fg degradation.

sequenced genomes, the sequences of primers used for cloning techniques and molecular mass.

Expression and purification of recombinant proteins

The amplified coding sequences, excluding the signal peptide tags, were cloned and expressed as full-length proteins in *E. coli*. The recombinant proteins were expressed with 6×His tag at the N-terminus and purified by nickel affinity chromatography, as previously described [35].

Interaction of leptospiral recombinant proteins with Fg

Proteins of *Leptospira* have been reported to bind Fg [15,16,17]. We thus decided to investigate whether the selected surface-exposed proteins were capable of binding human Fg *in vitro*. Seven recombinant leptospiral proteins, expressed and purified in our laboratory, LigB7-12, used as positive control [31,16,17], and the

negative protein controls gelatin and pneumococcal recombinant protein PspA, were individually placed onto 96-wells and incubated with previously immobilized human Fg. The binding was quantified by ELISA and the results obtained from three independent experiments are shown in Fig. 4. The protein bound to Fg was probed with the respective homolog polyclonal antiserum raised in mice (Fig. 4A) or with the monoclonal antibody anti-histidine tag (Fig. 4B). The percentage of binding for each protein with Fg, measured as a function of time is shown in Fig. 4C. The protein rLIC11360 promptly reacted with Fg with 40% of binding achieved after 5 min reaction, contrasting with rLIC11975 that showed very low binding activity at this time (Fig. 4C). The binding of recombinant proteins to Fg was also assessed after blocking the proteins with the corresponding antibody and after submitting them to denaturing conditions at 96°C for 10 min (Fig. 4D). The binding was totally inhibited by

Figure 4. Recombinant proteins binding to human Fg. Human Fg (10 $\mu\text{g/mL}$) was coated to ELISA plates and allowed to interact with the recombinant proteins (10 $\mu\text{g/mL}$). Gelatin was used as a negative control for nonspecific binding. The reaction was detected with polyclonal antibodies raised against each protein, including anti-DnaK, used as non-specific antibodies (M&M), in (A), (C) and (D) while monoclonal anti-polyhistidine HRP antibodies was employed in (B). In (C) the percentage of binding for each protein with Fg was measured as a function of time up to 2 h. The statistical analysis was performed by two-tailed *t* test ($*P<0.05$) compared to the binding after 2 h. The effect of denaturing the recombinant proteins by incubation for 10 min at 96°C or blocking the proteins with the respective antibodies for 1 h at 37°C , previously to interaction with Fg is shown in (D). Bars represent the mean of absorbance at $492_{\text{nm}} \pm$ the standard deviation of three replicates for each protein and are representative of three independent experiments. For statistical analyses, the binding of recombinant proteins to human Fg was compared to its binding to gelatin or untreated recombinant binding, in the case of (D) by two-tailed *t* test ($*P<0.05$). doi:10.1371/journal.pntd.0002396.g004

antibody-blocked protein in the case Lsa30, Lsa33, rLIC11975, rLIC12238 and rLIC11360, while a very low percentage of the binding remained for OmpL1 (8.4%), suggesting the participation of non- immunogenic epitopes on the interaction

(Fig. 4D).

Anti-DnaK serum, control employed as unrelated antibody, promoted a partial decrease on the binding of rLIC11360 and Lsa30, no effect with the protein Lsa33, while a slightly increase

Figure 5. Binding characterization of recombinant proteins to human Fg. (A) Ten $\mu\text{g/mL}$ of Fg was immobilized into 96-wells ELISA plates and 0 to 4,000 nM of each recombinant protein was added for interaction. The bindings were detected using antiserum raised in mice against each protein followed by HRP-conjugated anti-mouse IgG. Gelatin was employed as negative control for each assayed protein (not shown) and Lsa25, as a leptospiral recombinant protein negative control. Data represent the mean absorbance values $\pm$ the standard deviation of three replicates for each experimental group of three independent experiments. The insert shows the dose response curve obtained with 10 $\mu\text{g/mL}$ immobilized Fg and 0 to 3,000 nM LigB7-12, employed as leptospiral Fg-binding protein. The binding was detected with monoclonal anti-polyhistidine HRP antibodies. (B) The dissociation constant (K_D) was calculated based on ELISA data for the recombinant proteins that have reached the equilibrium concentration. Mean absorbance values at 492 nm ($\pm$ the standard deviations of three independent experiments) were compared to those obtained with untreated Fg (0 mM).

doi:10.1371/journal.pntd.0002396.g005

was detected with the proteins rLIC11975, rLIC12238 and OmpL1. At any rate, these differences were not statistically significant and are probably due to the presence of non-specific antibodies in the polyclonal serum. The adhesion of heat-denatured proteins to Fg was almost totally abolished in the case of rLIC12238 and OmpL1, 24% remained with rLIC11360, while 63–77% of the binding continued with Lsa30, Lsa33 and rLIC11975 (Fig. 4D). The results suggest that for some proteins the binding depends on their conformational structures

while with others it probably relies on their linear primary conformation.

Characterization of the binding of recombinant proteins to Fg

The interactions between the recombinant proteins and Fg was assessed on a quantitative basis, as indicated in Fig. 5A. Dose-dependent and saturable binding was observed when increasing

Figure 6. Inhibition of fibrin clot formation by recombinant proteins. Recombinant proteins were resuspended in 0.5 mL of PBS plus 1 mg/mL of Fg and incubated for 2 h at 37°C. The employed concentration of recombinant protein was the one in which there was a binding saturation to Fg: Lsa33 (3,000 nM), OmpL1 (3,000 nM), rLIC12238 (3,500 nM) and rLIC11975 (2,000 nM). The positive control protein LigB7-12 was employed at 1,500 nM, while the negative control proteins, Lsa25 and PspA were used at 3,000 nM. ELISA plates were coated with 90 µL/well of recombinant proteins plus Fg and 10 µL/well of thrombin (10 U/mL). The positive control of the reaction employed Fg (1 mg/mL) plus thrombin (10 U/mL) while in the negative control thrombin was omitted. The fibrin clot formation was measured every 1 min for 10 min and then every 5 min for 35 min. Each point was performed in triplicate and expressed as the mean absorbance value at 595 nm $\pm$ SD for each point. Bars represent the mean absorbance values $\pm$ standard deviation of three replicates for each condition and are representative of two independent experiments. doi:10.1371/journal.pntd.0002396.g006

concentrations (0 to 4,000 nM) of recombinant proteins rLIC12238, Lsa33, OmpL1, rLIC11975 and rLIC11360, or (0 to 2,000) of Lsa30, were allowed to individually adhere to a fixed human Fg amount (10 µg/mL) for 2 h. Saturation was reached with all except Lsa30 protein, due to the impossibility to achieve this protein at higher concentrations. In the case of LigB7-12, dose-response curve was measured using monoclonal anti-His tag antibodies, and the results depicted in the insert of Fig. 5A shows that saturation was not reached in the protein concentration range employed. Based on the ELISA data, the calculated dissociation equilibrium constants (K_D) for the recombinant proteins with Fg are depicted in Fig. 5B; the highest and the lowest K_D values were for rLIC12238 (733.3 ± 276.8 nM) and Lsa33 (128 ± 89.9 nM), respectively.

Inhibition of fibrin formation by recombinant proteins-bound to Fg

Since *Leptospira* bound to Fg inhibited thrombin-catalyzed fibrin formation, we decided to investigate whether the recombinant proteins bound to Fg were capable to mediate this interaction. The concentration of recombinant proteins used was the one in which there was a binding saturation to Fg (Lsa33 – 3,000 nM, OmpL1 – 3,000 nM, rLIC12238 – 3,500 nM and rLIC11975 – 2,000 nM). LigB7-12, previously shown to inhibit thrombin-catalyzed fibrin formation [16,17], was employed as positive control at 1,500 nM. Recombinant proteins Lsa25 and pneumococcal PspA that do not interact with Fg, were employed as negative controls, at 3000 nM. Each recombinant protein was pre-incubated with 1 mg/mL of Fg at 37°C for 2 h. The reaction mixtures were used to coat ELISA plates and 10 U/mL of thrombin was added per well. The fibrin clot formation was measured every 1 min for 10 min and then every 5 min for 35 min. The percentage of inhibition was calculated as a function of time, taking the complete reaction at

the last time-point, in the absence of proteins, as a 100% fibrin formation (positive control). In the negative control, thrombin was omitted from the reaction. The measurements were performed in triplicate and representative curves of two independent experiments are shown in Fig. 6. The proteins rLIC11360 and Lsa30 were not employed on these assays because they were kept at pH 12 for solubility and thrombin is not active above pH 10. The data show that the four proteins tested, Lsa33, rLIC12238, rLIC11975 and OmpL1, elicited an inhibition of 40–50% on the fibrin clot formation, similar to the one elicited by LigB7-12 (Fig. 6). This effect on clot formation by the recombinant proteins was similar with all of them, although a lag time was observed within the rLIC12238 inhibition curve. The inhibition promoted by all proteins was statistically relevant when compared to the positive reaction control. The results are consistent with the K_D of the proteins towards Fg that are in the same order of magnitude. In contrast, Lsa25 and PspA, proteins that do not react with Fg, were not capable to inhibit thrombin-catalyzed fibrin production, resulting in curves similar to the positive control of the reaction (Fig. 6).

Inhibition of live leptospires binding to Fg by recombinant proteins

The inhibitory effect exerted by recombinant proteins on leptospiral adherence to Fg was quantified by ELISA. Fg-coated microtiter wells were incubated with increasing concentration (0–4.5 µM) of rLIC12238 (Fig. 7A), rLIC11975 (Fig. 7B), Lsa30 (Fig. 7C), rLIC11360 (Fig. 7D), Lsa33 (Fig. 7E) and OmpL1 (Fig. 7F) for 90 min prior to the addition of 4×10^7 *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M-20. Wells were probed with anti-LipL32 serum, given the fact that LipL32 is a major membrane leptospiral protein [34]. The results are depicted in Figure 7 A to F, and show that the proteins caused a modest, but significant reduction in the number of leptospires adhering to Fg (* $P < 0.05$)

Figure 7. Inhibition of *L. interrogans* attachment to human Fg by recombinant proteins. Fg-coated microtiter wells were incubated with increasing concentration (0–4.5 μM) of rLIC12238 (A), rLIC11975 (B), Lsa30 (C), rLIC11360 (D), Lsa33 (E) and OmpL1 (F) for 90 min prior to the addition of 4×10^7 leptospires (*L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20). Wells were probed with anti-LipL32 serum (1:4,000). Data are expressed as $OD_{492\text{ nm}} \pm \text{SD}$ of three independent experiments, each performed in triplicate. Significance was assessed by comparison with the “no protein” wells by Students two-tailed *t* test (**P* < 0.05). doi:10.1371/journal.pntd.0002396.g007

with 0.5, 1.0, 1.0, 0.1, 0.25 and 1.0 μM of rLIC12238, rLIC11975, rLIC11360, Lsa30, Lsa33 and OmpL1, respectively. We have performed three independent experiments with comparable results.

Discussion

Fg is the major clotting protein present in blood plasma with an important role in coagulation and thrombosis. Several studies have suggested roles of Fg and PLG in host bacterial interactions [11]. The fibrinolytic system that generates PLA from PLG and its activators, decomposes the fibrin clot by degrading fibrin [37]. This system is negatively regulated by PLG activator inhibitors. A balance between coagulation system and anticoagulation is

necessary to avoid pathophysiological conditions, such as, bleeding and thrombosis [38].

Several Fg-binding proteins of important pathogens, such as, *Staphylococcus aureus* [39], group B *Streptococcus* [40], *Lactobacillus salivarius* [41] and the spirochetes *Treponema pallidum* [42], *T. denticola* [43,44,45] have been reported and characterized. These Fg-binding proteins are bacterial surface or secreted adhesins that although acting through different mechanisms will ultimately lead to enhance the bacterial survival in the host [46].

The adhesion of virulent *L. interrogans* strain Fiocruz L1-130 to Fg has been shown to be induced by physiological osmolality, but the effect of this binding on fibrin clot formation was not evaluated [14]. The leptospiral proteins, LigA and LigB [16,17] and OmpL37 [15] have been described as Fg-binding proteins. In

addition, the interaction of LigB with Fg was shown to inhibit thrombin-catalyzed fibrin formation [16,17].

In this work, we show that *L. interrogans* serovar Copenhageni are capable of binding human Fg on their surface, as visualized by indirect IFA. Moreover, we have employed ELISA to assess the interaction of human Fg with virulent *L. interrogans* serovar Copenhageni Fiocruz L1-130, attenuated *L. interrogans* serovar Copenhageni M-20 and non-pathogenic saprophytic *L. biflexa* serovar Patoc Patoc 1, and the effect of this binding on the thrombin-catalyzed fibrin formation. Moreover, we studied seven leptospiral adhesin- and PLG-binding proteins, rLIC12238 [18], Lsa33, Lsa25 [19], Lsa30 [20], OmpL1 [21], rLIC11360 and rLIC11975 [22] for their capacity to bind Fg and to inhibit fibrin clot formation. We show that all strains tested bind Fg, including the saprophytic one, and that this interaction inhibits fibrin clot formation. Though the virulent strain appears to be more efficient, the values obtained were not statistically significant. Attachment of recombinant proteins to Fg was specific, dose-dependent and saturable with all proteins but Lsa30. The interaction of the proteins with Fg, similar to the *Leptospira*, promoted an inhibition on thrombin-induced fibrin clot formation. Thus, *Leptospira*, similar to other pathogens, express multiple Fg-binding proteins [38,46].

As expected, recombinant proteins partially inhibited attachment of intact *L. interrogans* to immobilized Fg. The inhibitory effect exerted by the recombinant proteins was moderate, ranging from 0.1 to 1.0 μ M of protein concentration to reach significance, and could be explained by the existence of additional *L. interrogans* binding proteins contributing to the leptospiral adherence to Fg. A correlation between inhibition and affinity was detected with the recombinant protein Lsa33, while no correspondence was seen with the others.

The inhibitory effect on fibrin formation observed with leptospires and with the six recombinant proteins was partial, similar to the LigB, fragment 7–12, employed in this work as positive control, and previously reported by Choy et al., 2011 [16], using LigB fragment 9–11. Our data differ with the total clotting inhibition promoted by the Fg-binding proteins, SdrG of *S. epidermidis* [47], ClfA of *S. aureus* [48] and LigBCen2R [17]. The data suggest that in *Leptospira* other mechanisms might be involved in fibrin formation and/or the main function of these Fg-binding proteins is not associated with the clotting.

We have described the interaction of *Leptospira* with fibrinolytic system and shown that it occurs with virulent, attenuated and saprophyte strains of *Leptospira*. Moreover, we demonstrated that this association renders the bacteria with proteolytic activity capable of degrading ECM components [12]. Several membrane

proteins were identified as PLG-binding receptors capable of generating PLA in the presence of activator, suggesting that the interaction with the fibrinolytic system might be important during leptospirosis [49,18,50,36,19,21,20]. Indeed, the increased plasma levels of Fg degradation products detected in leptospirosis has provided evidence for fibrinolysis activity [51,52]. We show now that *Leptospira* surface-associated PLA activity is capable to degrade Fg *in vitro*, suggesting one possible pathway to generate Fg metabolites during the disease.

Fg is considerably upregulated during inflammation or under exposure to stress such systemic infections [46]. The activation of coagulation cascade with increased levels of plasma Fg during leptospirosis has been detected [53,51,54]. It has been suggested that these findings are possibly associated to severe tissue damage, vascular endothelial injury or a compensating production by the liver in response to the augmented Fg utilization [55,53,51]. Our data show that *Leptospira* either through their Fg-binding proteins or coated with PLA activity would increase the consumption of Fg molecules by sequestering or degrading them. Under these circumstances, a reduction on fibrin clot formation is expected. In addition, leptospirosis patients with clinical bleeding were reported to have lower platelet counts when compared to other patients [54], a condition that would help decrease thrombosis, facilitate bleeding and help bacterial dissemination.

In conclusion, we have provided molecular evidence of the mechanisms that *Leptospira* could employ to interact with components of the coagulation cascade and the fibrinolytic system. In addition, we have shown that six adhesins could mediate the binding of *Leptospira* to Fg and impair thrombin-induced fibrin clot formation. We believe that our results should contribute to the understanding of the complex coagulopathy observed during leptospirosis.

Acknowledgments

We are deeply in debt to Drs. Odir Dellagostin (UFPEL, RS, Brazil), Yung-Fu Chang (Cornell University, Ithaca, New York, USA), Luciana Leite, (Instituto Butantan, SP, Brazil) for their generous donation of LigB and PspA plasmids, and to Dr. Henrique Krambeck Rofatto (Departamento de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil) for use of the confocal microscope facilities and helpful discussion.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RO SAV ALTON. Performed the experiments: RO RFD GHS LGF NMS MLV ZMdM. Analyzed the data: RO RFD GHS LGF NMS MLV ZMdM SAV ALTON. Contributed reagents/materials/analysis tools: SAV ALTON. Wrote the paper: RO RFD GHS LGF NMS MLV ZMdM SAV ALTON.

References

- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (1999) *Leptospira* and Leptospirosis. Melbourne, Australia: MediSci Press.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, et al. (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757–771.
- Levett PN (2001) Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296–326.
- Plank R, Dean D (2000) Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect* 2: 1265–1276.
- McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI (2005) Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 18: 376–386.
- Marotto PC, Ko AI, Murta-Nascimento C, Seguro AC, Prado RR, et al. (2010) Early identification of leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome by use of a validated prediction model. *J Infect* 60: 218–223.
- Zhang YX, Geng Y, Bi B, He JY, Wu CF, et al. (2005) Identification and classification of all potential hemolysin encoding genes and their products from *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Lai. *Acta Pharmacol Sin* 26: 453–461.
- Hauk P, Negrotto S, Romero EC, Vasconcellos SA, Genovez ME, et al. (2005) Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: potentiation of hemolytic activity by LipL32. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 1341–1347.
- Carvalho E, Barbosa AS, Gomez RM, Cianciarullo AM, Hauk P, et al. (2009) Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. *FEBS Lett* 17: 1381–5.
- Degen JL, Bugge TH, Goguen JD (2007) Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1: 24–31.
- Lahteenmaki K, Kuusela P, Korhonen TK (2001) Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev* 25: 531–552.
- Vieira ML, Vasconcellos SA, Goncalves AP, de Moraes ZM, Nascimento AL (2009) Plasminogen acquisition and activation at the surface of *Leptospira* species lead to fibronectin degradation. *Infect Immun* 77: 4092–4101.
- Vieira ML, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Romero EC, Nascimento AL (2011) In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. *Microb Pathog* 51: 360–365.

14. Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J, et al. (2007) Physiological osmotic induction of *Leptospira* interorgans adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun* 75: 2441–2450.
15. Pinne M, Choy HA, Haake DA (2010) The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e815.
16. Choy HA, Kelley MM, Croda J, Matsunaga J, Babbitt JT, et al. (2011) The multifunctional LigB adhesin binds homeostatic proteins with potential roles in cutaneous infection by pathogenic *Leptospira* interorgans. *PLoS One* 6: e16879.
17. Lin YP, McDonough SP, Sharma Y, Chang YF (2011) *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen alphaC domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. *Mol Microbiol* 79: 1063–1076.
18. Vieira ML, Atzingen MV, Oliveira TR, Oliveira R, Andrade DM, et al. (2010) In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira* interorgans. *PLoS One* 5: e11259.
19. Domingos RF, Vieira ML, Romero EC, Goncalves AP, de Moraes ZM, et al. (2012) Features of two proteins of *Leptospira* interorgans with potential role in host-pathogen interactions. *BMC Microbiol* 12: 50.
20. Souza NM, Vieira ML, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, et al. (2012) Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira* interorgans binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. *Microb Pathog* 53: 125–134.
21. Fernandes LG, Vieira ML, Kirchgatter K, Alves IJ, de Moraes ZM, et al. (2012) OmpL1 Is an Extracellular Matrix- and Plasminogen-Interacting Protein of *Leptospira* spp. *Infect Immun* 80: 3679–3692.
22. Siqueira GH, Atzingen MV, Alves IJ, Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento ALTO (2013) Characterization of three novel adhesins of *Leptospira* interorgans. *Am J Trop Med Hyg*: [In press]
23. Turner LH (1970) Leptospirosis. 3. Maintenance, isolation and demonstration of leptospires. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 64: 623–646.
24. Nakai K, Kanehisa M (1991) Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* 11: 95–110.
25. Nakai K, Horton P (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24: 34–36.
26. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5857–5864.
27. Letunic I, Copley RR, Pils B, Pinkert S, Schultz J, et al. (2006) SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res* 34: D257–260.
28. Finn RD, Mistry J, Schuster-Bockler B, Griffiths-Jones S, Hollich V, et al. (2006) Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* 34: D247–251.
29. Juncker AS, Willenbrock H, Von Heijne G, Brunak S, Nielsen H, et al. (2003) Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci* 12: 1652–1662.
30. Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL (2004) A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res* 37: 1103–1109.
31. Forster KM, Hartwig DD, Seixas FK, Bacelo KL, Amaral M, et al. (2013) A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response against leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol* 20: 725–731.
32. Goulart C, Darrieux M, Rodriguez D, Pimenta FC, Brandileone MC, et al. (2011) Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. *Vaccine* 29: 1634–1642.
33. Lin YP, Lee DW, McDonough SP, Nicholson LK, Sharma Y, et al. (2009) Repeated domains of leptospira immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. *J Biol Chem* 284: 19380–19391.
34. Malmstrom J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, et al. (2009) Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira* interorgans. *Nature* 460: 762–765.
35. Atzingen MV, Barbosa AS, De Brito T, Vasconcellos SA, de Moraes ZM, et al. (2008) Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC Microbiol* 8: 70.
36. Oliveira R, de Moraes ZM, Goncalves AP, Romero EC, Vasconcellos SA, et al. (2011) Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira* interorgans that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PLoS One* 6: e21962.
37. Weisel JW (2005) Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem* 70: 247–299.
38. Sun H (2006) The interaction between pathogens and the host coagulation system. *Physiology (Bethesda)* 21: 281–288.
39. Flick MJ, Du X, Prasad JM, Raghu H, Palumbo JS, et al. (2013) Genetic elimination of the binding motif on fibrinogen for the *S. aureus* virulence factor ClfA improves host survival in septicemia. *Blood* 121: 1783–1794.
40. Dramsi S, Morello E, Poyart C, Trieu-Cuot P (2012) Epidemiologically and clinically relevant Group B *Streptococcus* isolates do not bind collagen but display enhanced binding to human fibrinogen. *Microbes Infect* 14: 1044–1048.
41. Collins J, van Pijkeren JP, Svensson L, Claesson MJ, Sturme M, et al. (2012) Fibrinogen-binding and platelet-aggregation activities of a *Lactobacillus salivarius* septicemia isolate are mediated by a novel fibrinogen-binding protein. *Mol Microbiol* 85: 862–877.
42. Houston CV, Hof R, Francescutti T, Hawkes A, Boulanger MJ, et al. (2011) Bifunctional role of the *Treponema pallidum* extracellular matrix binding adhesin Tp0751. *Infect Immun* 79: 1386–1398.
43. Haaapasalo M, Muller KH, Uitto VJ, Leung WK, McBride BC (1992) Characterization, cloning, and binding properties of the major 53-kilodalton *Treponema denticola* surface antigen. *Infect Immun* 60: 2058–2065.
44. Edwards AM, Jenkinson HF, Woodward MJ, Dymock D (2005) Binding properties and adhesion-mediating regions of the major sheath protein of *Treponema denticola* ATCC 35405. *Infect Immun* 73: 2891–2898.
45. Bamford CV, Fenno JC, Jenkinson HF, Dymock D (2007) The chymotrypsin-like protease complex of *Treponema denticola* ATCC 35405 mediates fibrinogen adherence and degradation. *Infect Immun* 75: 4364–4372.
46. Rivera J, Vannakambadi G, Hook M, Speziale P (2007) Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. *Thromb Haemostasis* 98: 503–511.
47. Davis SL, Gurusiddappa S, McCrea KW, Perkins S, Hook M (2001) SdrG, a fibrinogen-binding bacterial adhesin of the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules subfamily from *Staphylococcus epidermidis*, targets the thrombin cleavage site in the Bbeta chain. *J Biol Chem* 276: 27799–27805.
48. Liu CZ, Shih MH, Tsai PJ (2005) ClfA(221–550), a fibrinogen-binding segment of *Staphylococcus aureus* clumping factor A, disrupts fibrinogen function. *Thromb Haemostasis* 94: 286–294.
49. Verma A, Brissette CA, Bowman AA, Shah ST, Zipfel PF, et al. (2010) Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infect Immun* 78: 2053–2059.
50. Mendes RS, Von Atzingen M, de Moraes ZM, Goncalves AP, Serrano SM, et al. (2011) The novel leptospiral surface adhesin Lsa20 binds laminin and human plasminogen and is probably expressed during infection. *Infect Immun* 79: 4657–4667.
51. Wagenaar JF, Goris MG, Sakundarno MS, Gasem MH, Mairuhu AT, et al. (2007) What role do coagulation disorders play in the pathogenesis of leptospirosis? *Trop Med Int Health* 12: 111–122.
52. Wagenaar JF, Goris MG, Partiningrum DL, Isbandrio B, Hartskeerl RA, et al. (2010) Coagulation disorders in patients with severe leptospirosis are associated with severe bleeding and mortality. *Trop Med Int Health* 15: 152–159.
53. De Francesco Daher E, Oliveira Neto FH, Ramirez SM (2002) Evaluation of hemostasis disorders and anticardiolipin antibody in patients with severe leptospirosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 44: 85–90.
54. Chierakul W, Tientadakul P, Suputtamongkol Y, Wuthiekanun V, Phimda K, et al. (2008) Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. *Clin Infect Dis* 46: 254–260.
55. Higgins R, Cousineau G (1977) The pathogenesis of leptospirosis I. Hemorrhages in experimental leptospirosis in guinea pigs. *Can J Comp Med* 41: 174–181.
56. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, et al. (2003) Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira* interorgans revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 422: 888–893.
57. Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, et al. (2006) Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14560–14565.
58. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, et al. (2008) Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One* 3: e1607.
59. Ricaldi JN, Fouts DE, Selengut JD, Harkins DM, Patra KP, et al. (2012) Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1853.
60. Chou LF, Chen YT, Lu CW, Ko YC, Tang CY, et al. (2012) Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. *Gene* 511: 364–370.

Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen–host interactions

Monica L. Vieira¹, Luis G. Fernandes^{1,2}, Renan F. Domingos^{1,2}, Rosane Oliveira^{1,2}, Gabriela H. Siqueira^{1,2}, Natalie M. Souza^{1,2}, Aline R.F. Teixeira^{1,2}, Marina V. Atzingen¹ & Ana L.T.O. Nascimento^{1,2}

¹Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil; and ²Programa Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence: Ana L.T.O. Nascimento, Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil.
Tel.: 5511 2627 9829;
fax: 5511 3726 9233;
e-mail: ana.nascimento@butantan.gov.br

Received 23 August 2013; revised 19 November 2013; accepted 26 November 2013. Final version published online 11 December 2013.

DOI: 10.1111/1574-6968.12349

Editor: Mark Schembri

Keywords

leptospirosis; infectious diseases; bacterial diseases.

Abstract

Leptospirosis is been considered an important infectious disease that affects humans and animals worldwide. This review summarizes our current knowledge of bacterial attachment to extracellular matrix (ECM) components and discusses the possible role of these interactions for leptospiral pathogenesis. Leptospiral proteins show different binding specificity for ECM molecules: some are exclusive laminin-binding proteins (Lsa24/LfhA/LenA, Lsa27), while others have broader spectrum binding profiles (LigB, Lsa21, LipL53). These proteins may play a primary role in the colonization of host tissues. Moreover, there are multifunctional proteins that exhibit binding activities toward a number of target proteins including plasminogen/plasmin and regulators of the complement system, and as such, might also act in bacterial dissemination and immune evasion processes. Many ECM-interacting proteins are recognized by human leptospirosis serum samples indicating their expression during infection. This compilation of data should enhance our understanding of the molecular mechanisms of leptospiral pathogenesis.

Introduction

The genus *Leptospira* encompasses both pathogenic and saprophytic species. Pathogenic *Leptospira* are the etiological agents of leptospirosis, while saprophytic bacteria are environment free-living organisms. *Leptospira* are classified according to serovar status – more than 250 pathogenic serovars have been identified. Structural heterogeneity in lipopolysaccharide moieties seems to be the basis for the great degree of antigenic variation observed among serovars. Humans are accidental hosts that become infected through contact with wild or domestic animals or exposure to contaminated soil or water (Adler & de la Pena Moctezuma, 2010).

Leptospire enter the host mainly via intact sodden or damaged skin or mucosa. The initial phase exhibits wide-ranging and nonspecific symptoms such as fever, chills, headache, and myalgia. Leptospirosis can progress

to a severe condition known as Weil's syndrome, corresponding to 5–15% of the reported cases. Another severe manifestation of the disease, the leptospirosis pulmonary hemorrhage syndrome, was first described in North Korea and China and has been increasingly reported worldwide (McBride *et al.*, 2005).

Currently available veterinarian and human vaccines are based on inactivated whole cell or membrane preparations of pathogenic leptospire. However, these vaccines do not induce long-term protection against infection and do not provide cross-protective immunity against leptospiral serovars not included in the vaccine preparation. Several recombinant proteins have been tested as potential vaccines, but only a few are able to confer partial protection against challenge with virulent leptospire (Silva *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2010; Felix *et al.*, 2011).

In the past 10 years, we have witnessed an increase in our knowledge of *Leptospira* and leptospirosis. Modern

molecular approaches, such as genomics, proteomics, and mutagenesis, have produced a great amount of data. Several identified proteins have been described to interact with extracellular matrix (ECM) molecules. This review aims to assemble the current knowledge of leptospiral adhesins focusing on the host interactions for this pathogen and pointing out new trends for the characterization of these attachment proteins.

Extracellular matrix

The ECM is an intricate network of macromolecules, whose primary role includes supporting and connecting cells and tissues. Two main classes of macromolecules constitute the ECM: (1) polysaccharide chains of glycosaminoglycans (GAGs) (Varki *et al.*, 2009) and (2) fibrous proteins, such as collagen, elastin, fibronectin, and laminin (Alberts *et al.*, 2007).

The GAGs are long unbranched polysaccharides constructed of repeating disaccharide units. They are highly negatively charged molecules that permit high hydration, viscosity, and interaction with other molecules (Varki *et al.*, 2009). The most important GAGs for the ECM composition are hyaluronic acid, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, keratan sulfate, heparan sulfate, and heparin.

Collagens are the most abundant proteins found in the animal kingdom and the major protein constituents in the ECM, providing tensile strength, regulating cell adhesion, supporting chemotaxis and migration. Laminin is a multi-adhesive protein that binds to numerous proteoglycans, type IV collagen, and certain receptors on the cells surface, such as integrins, an important class of cell adhesion molecules. Fibronectins are complex glycoproteins present in plasma and in ECM that display important multi-adhesive properties. Fibronectin contains different domains of high-affinity binding sites for collagen, heparin, gelatin, and integrins (via RGD motif), thereby attaching cells to the ECM (Chagnot *et al.*, 2012). Plasma fibronectin circulating in the blood can bind to fibrin, activated platelets and enhance blood clotting (Lodish *et al.*, 2000). The elastin results in the assembly of the monomeric precursor tropoelastin (Muiznieks *et al.*, 2010). Elastin proportionally provides a degree of elasticity to the ECM, and further permits molecular interaction with ECM components such as proteoglycans, fibulin, and fibrillin (Hayes *et al.*, 2011).

Leptospiral adhesion to ECM

The adhesion of *Leptospira* to cultured mammalian cells was reported, and the efficiency of attachment was correlated with bacterial virulence (Thomas & Higbie, 1990).

The direct attachment of *Leptospira interrogans* to the ECM proteins laminin, collagen type I, collagen type IV, cellular and plasma fibronectin was reported indicating the existence of multiple adhesion molecules (Barbosa *et al.*, 2006). Leptospiral binding to elastin and its precursor, tropoelastin, was described further stressing the presence of a broad spectrum of binding proteins (Lin *et al.*, 2009). Moreover, the interaction of *L. interrogans* to the GAGs chondroitin sulfate and heparan sulfate has been reported (Breiner *et al.*, 2009).

The first described leptospiral adhesin

The first leptospiral adhesin was a 36-kDa fibronectin-binding protein isolated from the outer sheath of a virulent variant of pathogenic leptospires (Merien *et al.*, 2000). This adhesin was described to be expressed in virulent *L. interrogans*, totally lost during virulence attenuation and absent in the saprophytic strain *Leptospira biflexa* serovar Patoc I. Evidence of surface-exposed localization of this 36-kDa protein was provided by proteinase K treatment that abolished its fibronectin-binding activity. Table 1 and Supporting Information, Table S1 depict features of the published ECM-binding proteins, and Fig. 1 illustrates a model of membrane architecture featuring the leptospiral adhesins described by our group. The drawing illustrates an outer membrane (OM), a cytoplasmic or inner membrane (IM), and the peptidoglycan (PG) cell wall closely associated with the IM. Protein location was based on previous individually published results (Table S1).

LfhA/Lsa24, and related Len proteins

Studies performed in our laboratory described the first leptospiral protein that exhibited attachment to purified laminin (Barbosa *et al.*, 2006). The protein encoded by the gene LIC12906 was named Lsa24 for leptospiral surface adhesin of 24 kDa. Lsa24 binds strongly to laminin in a specific, dose-dependent, and saturable fashion. Complementary experiments showed that Lsa24 could partially block live leptospires from binding to immobilized laminin, evidencing the participation of this protein in attachment, but also implying the expression of other proteins involved in the interaction. This protein was previously described as a binding protein of both, factor H and factor H-related protein 1 of *L. interrogans*, named LfhA (leptospiral factor H-binding protein A; Verma *et al.*, 2006). Subsequently, Stevenson *et al.* (2007) reported that this gene possesses five paralogs, distributed and limited to virulent leptospires (Stevenson *et al.*, 2007). Because of their similarities to mammalian endostatins, these proteins were called Len proteins, for leptospi-

Table 1. Features of identified ECM-binding proteins of *Leptospira*

LIC*	NCBI accession number†	Given name	ECM ligands	Method	K _d (nM)	Inhibition of <i>Leptospira</i> interaction	Genetic confirmation	References	Other known host ligands‡	References§
ND	ND	36 kDa protein	Fibronectin	Western blot	ND	ND	ND	Merien <i>et al.</i> (2000)	ND	–
LIC12906	YP_002822	Lsa24/LenA	Laminin	ELISA Western blot	ND	Protein: partial	ND	Barbosa <i>et al.</i> (2006), Stevenson <i>et al.</i> (2007)	Plasminogen Factor H FHL-1	Verma <i>et al.</i> (2010, 2006)
LIC10997	YP_000971	LenB	Fibronectin Laminin	ELISA Western blot	118 ± 39 106 ± 8	ND	ND	Stevenson <i>et al.</i> (2007)	ND	–
LIC13006	YP_002919	LenC	Fibronectin Laminin	Western blot	ND ND	ND	ND	Stevenson <i>et al.</i> (2007)	ND	–
LIC12315	YP_002249	LenD	Fibronectin Laminin	Western blot	ND ND	ND	ND	Stevenson <i>et al.</i> (2007)	ND	–
LIC13467	YP_003369	LenE	Fibronectin Laminin	Western blot	ND ND	ND	ND	Stevenson <i>et al.</i> (2007)	ND	–
LIC13248	YP_003155	LenF	Fibronectin Laminin	Western blot	ND ND	ND	ND	Stevenson <i>et al.</i> (2007)	ND	–
LIC11352	YP_001316	LipL32	Laminin Collagen I Collagen V Collagen IV Collagen XX Fibronectin	ELISA Phage display†	ND ND ND 599 ± 12 ND 101 ± 30	Protein: no effect Antisera: no effect	<i>L. interrogans</i> <i>lipL32</i> mutants: no effect	Hoke <i>et al.</i> (2008), Hauk <i>et al.</i> (2008), Murray <i>et al.</i> (2009a, b), Chaemchuen <i>et al.</i> (2011)	Plasminogen	Vieira <i>et al.</i> (2010)
LIC10465	YP_000449	LigA	Collagen I Collagen IV Laminin Fibronectin Tropoelastin	ELISA SSFS** ITC**	** ** ** ** **	Protein: partial	<i>L. biflexa</i> transformation: positive effect§§	Choy <i>et al.</i> (2007), Lin <i>et al.</i> (2009)	Fibrinogen Factor H FHL-1 FHR-1 C4bp	Choy <i>et al.</i> (2007), Castiblanco-Valencia <i>et al.</i> (2012)
LIC10464	YP_000448	LigB	Collagen I Collagen IV Laminin Fibronectin Collagen III Elastin Tropoelastin Heparin	ELISA SSFS** ITC** Phage display††	** ** ** ** ** ** ND	Protein: partial	<i>L. biflexa</i> transformation: positive effect§§	Choy <i>et al.</i> (2007, 2011), Lin <i>et al.</i> (2009), Ching <i>et al.</i> (2012)	Fibrinogen Factor H FHL-1 FHR-1 C4bp	Choy <i>et al.</i> (2007), Castiblanco-Valencia <i>et al.</i> (2012)
LIC10258	YP_000249	Lsa66	Laminin Fibronectin	ELISA Protein microarray	55 ± 15 290 ± 11	Protein: partial	ND	Oliveira <i>et al.</i> (2011), Pinne <i>et al.</i> (2012)	Plasminogen	Oliveira <i>et al.</i> (2011)

Table 1. Continued

LIC*	NCBI accession number [†]	Given name	ECM ligands	Method	K _d (nM)	Inhibition of <i>Leptospira</i> interaction	Genetic confirmation	References	Other known host ligands [‡]	References [§]
LIC12895	YP_002811	Lsa27	Laminin	ELISA	ND	ND	ND	Longhi et al. (2009)	ND	–
LIC11469	YP_001430	Lsa20	Laminin	ELISA SPR	1988 ± 563	Protein: partial	ND	Mendes et al. (2011)	Plasminogen	Mendes et al. (2011)
LIC12253	YP_002188	Lsa25	Laminin	ELISA	415 ± 203	Protein: partial	ND	Domingos et al. (2012)	C4bp	Domingos et al. (2012)
LIC11834	YP_001783	Lsa33	Laminin	ELISA	367 ± 248	Protein: partial	ND	Domingos et al. (2012)	Plasminogen C4bp	Domingos et al. (2012)
LIC12976	YP_002889	rLIC12976	Laminin	Phage display ELISA	ND	ND	ND	Lima et al. (2013)	ND	–
LIC12690	YP_002611	Lp95	Laminin Fibronectin	Western blot	ND ND	ND	ND	Atzingen et al. (2009)	ND	–
LIC12099	YP_002033	LipL53	Laminin Collagen IV Fibronectin	ELISA	ND ND ND	ND	ND	Oliveira et al. (2010)	ND	–
LIC10368	YP_000355	Lsa21	Laminin Collagen IV Fibronectin	ELISA	ND ND ND	ND	ND	Atzingen et al. (2008)	ND	–
LIC10314	YP_000304	Lsa63	Laminin Collagen IV	ELISA	ND ND	Protein: partial	ND	Vieira et al. (2010)	ND	–
LIC11087	YP_001057	Lsa30	Laminin Fibronectin	ELISA	292 ± 24 157 ± 35	ND	ND	Souza et al. (2012)	Plasminogen C4bp	Souza et al. (2012)
LIC10973	YP_000947	Ompl1	Laminin Fibronectin	ELISA	2099 ± 871 1239 ± 506	Protein: partial	ND	Fernandes et al. (2012)	Plasminogen	Fernandes et al. (2012)
LIC12263	YP_002198	Ompl37	Laminin Fibronectin Elastin	ELISA	410 ± 81 359 ± 68 104 ± 19	Protein: no effect Antisera: enhances interaction	ND	Pinne et al. (2010)	Fibrinogen	Pinne et al. (2010)
LIC13050	YP_002962	Ompl47	Laminin Collagen III Fibronectin Elastin	ELISA	ND ND ND ND	ND	ND	Pinne et al. (2010)	Fibrinogen	Pinne et al. (2010)
LIC11612	YP_001570	MFen1	Fibronectin	Protein microarray Western blot	ND	ND	ND	Pinne et al. (2012)	ND	–
							<i>L. biflexa</i> transformation: positive effect			

Table 1. Continued

LIC*	NCBI accession number [†]	Given name	ECM ligands	Method	K _d (nM)	Inhibition of <i>Leptospira</i> interaction	Genetic confirmation	References	Other known host ligands [‡]	References [§]
LIC10714	YP_000698	MFn2	Fibronectin	Protein microarray Western blot	ND	ND	ND	Pinne <i>et al.</i> (2012)	ND	–
LIC11051	YP_001021	MFn6	Fibronectin	Protein microarray Western blot	ND	ND	ND	Pinne <i>et al.</i> (2012)	ND	–
LIC11436	YP_001398	MFn7	Fibronectin	Protein microarray Western blot	ND	ND	<i>L. biflexa</i> transformation: positive effect	Pinne <i>et al.</i> (2012)	ND	–
LIC10537	YP_000521	MFn9	Fibronectin	Protein microarray Western blot	ND	ND	ND	Pinne <i>et al.</i> (2012)	ND	–
LIC13143	YP_003051	TlyC	Laminin Collagen IV Fibronectin	ELISA	184 ± 13 105 ± 1 89 ± 7	Protein: partial	ND	Cavalho <i>et al.</i> (2009)	ND	–

ECM, extracellular matrix; K_d, Dissociation constant; ND, not determined; SSFS, steady-state fluorescence spectroscopy; ITC, isothermal titration calorimetry; SPR, surface plasmon resonance.

**Leptospira interrogans* serovar Copenhageni L1-130 genome annotation (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>; Nascimento *et al.*, 2004).

[†]<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>.

[‡]Others ligands.

[§]References relative to information depicted in 3.

*For laminin and collagen type XX.

**For elastin and tropoelastin.

**For heparin.

††Determined only for protein fragments.

§§For fibronectin.

Fig. 1. Schematic representation of the *Leptospira* cell membrane. The leptospiral membrane shares characteristics of both Gram-negative and Gram-positive bacteria. Depicted are OM, IM, and lipopolysaccharide (LPS). In the periplasmic space (PS), the PG is found strongly associated with the (IM). In this diagram, the protoplasmic cylinder (PC) is also shown, containing the nucleoid. The endoflagella (F), responsible for bacterial motility, are located in the (PS). Illustrated are well-characterized published adhesins.

spiral endostatin-like. LenA protein (formerly called LfhA and Lsa24) and the homologs were named LenB, LenC, LenD, LenE, and LenF. LenB was found to bind human factor H, and all Len proteins showed laminin-binding capacity. In addition, LenB, LenC, LenD, LenE, and LenF exhibited affinity for fibronectin. However, *lenB* and *lenE* leptospiral mutant strains did not present an attenuated phenotype, suggesting that the corresponding proteins are not crucial for virulence (Murray *et al.*, 2009a).

LipL32

LipL32 was first described as an OM lipoprotein only found in pathogenic leptospires (Haake *et al.*, 2000). The ECM-binding capacity of LipL32 has been shown by independent studies. One showed that recombinant LipL32 selectively binds to the individual components laminin and collagens I and V, where the carboxy-terminal is designated as the binding region (Hoke *et al.*, 2008), while the other reported that LipL32 interacts with collagen IV and plasma fibronectin and confirmed that the carboxy-terminal portion was responsible for the binding (Hauk *et al.*, 2008). Calcium binding to LipL32 was suggested to be important for the interaction with fibronectin (Tung *et al.*, 2009). However, these results were not confirmed by other authors that

showed that calcium binding to LipL32, although important to stabilize the protein structure, is not required to mediate interaction with host ECM proteins (Hauk *et al.*, 2012).

However, despite LipL32 abundance in bacteria cell (Malmstrom *et al.*, 2009) and its presence limited to pathogenic species, mutagenesis experiments with mutants lacking the *lipL32* gene surprisingly showed that this protein is not essential for the bacterial survival during acute or chronic infection of *L. interrogans* (Murray *et al.*, 2009b). In addition, LipL32 cellular position was recently reexamined, and evidence supporting subsurface location was presented in place of surface exposure (Pinne & Haake, 2013). Thus, it appears that more studies are needed to establish the role of LipL32 in mediating *Leptospira*–host interaction.

Leptospiral immunoglobulin-like proteins

Members of the Lig family of genes in *L. interrogans* that encode OM proteins with immunoglobulin-like repeats were identified (Matsunaga *et al.*, 2003). LigA was first cloned and characterized by Palaniappan *et al.* (2002) that showed its expression during infection *in vivo*. The *L. interrogans* Lig proteins are present only in pathogenic species, expressed during infection, absent after attenuation by culture passage (Matsunaga *et al.*, 2003), and upregulated under physiological osmolarity stimuli (Matsunaga *et al.*, 2005). Based on this evidence, the Lig proteins were thought to be important for leptospirosis pathogenesis. The potential of the Lig proteins as vaccine candidates and diagnostic markers has also been proposed (Yan *et al.*, 2009).

Choy *et al.* (2007) first described LigA and LigB as leptospiral ECM-binding proteins capable of interacting with fibronectin, laminin, and collagen IV and I. The adhesive regions were attributed to the unique regions of each protein, instead of the shared bacterial immunoglobulin-like (Big) repeats. Further studies have also shown LigB to interact with collagen type III (Choy *et al.*, 2011). The high-affinity fibronectin-binding region was identified and found to comprise amino acid residues from 1014 to 1165. This portion includes part of the Big domain and a nonrepeated region in the variable C-terminal portion, which also binds laminin, but not collagen (Lin & Chang, 2008).

Although leptospiral strains with mutation of *ligB* does not attenuated the virulence in the hamster model of infection (Croda *et al.*, 2008), heterologous expression of *ligA* and *ligB* genes using the saprophyte *L. biflexa* as a surrogate host improved the adhesion to fibronectin and to cultured cells. Although LigB has been shown to inter-

act with collagen and elastin (Choy *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2009), *L. biflexa* lig mutants were not capable of binding collagens (type I and IV) or elastin more efficient than wild-type cells (Figueira *et al.*, 2011). Thus, it appears that more investigations are needed to establish the function of Lig proteins in virulence.

Outer membrane protein A-like proteins

Outer membrane protein A (OmpA) is a major heat-modifiable surface-exposed protein in *Escherichia coli* and is one of the best-characterized OMPs (Confer & Ayalew, 2013). OmpA protein of *E. coli* and other enterobacteria has been reported to act as adhesin/invasin (Smith *et al.*, 2007).

The first protein identified in pathogenic *Leptospira* containing a carboxy-terminal OmpA domain was a lipoprotein of 22 kDa, named Loa22 (Koizumi & Watanabe, 2003). The OmpA-like protein Loa22 was reported to be essential for the leptospiral virulence, as mutants lacking Loa22 expression resulted in attenuated virulence in an animal model of acute infection (Ristow *et al.*, 2007). However, work performed in our laboratory showed that Loa22 had a modest interaction with the ECM molecules tested: laminin, collagen I, collagen IV, cellular and plasma fibronectin (Barbosa *et al.*, 2006). Hence, although a potential leptospiral virulence factor, Loa22 is not an ECM-interacting protein.

Oliveira *et al.* (2011) identified a novel leptospiral hypothetical protein, encoded by the gene LIC10258, which has a putative OmpA-like domain comprising 504–583 amino acid residues in the carboxy-terminal region. The recombinant protein, named Lsa66, showed laminin and plasma fibronectin-binding properties. Moreover, antibodies in serum samples of leptospirosis cases recognize Lsa66, suggesting its expression during infection. The presence of this protein in *Leptospira*, as a fibronectin ligand, was further corroborated by other studies using high-throughput microarray strategies (Pinne *et al.*, 2012).

Laminin-binding adhesins

Bioinformatics have predicted 184 coding sequences that appeared to be exported to the leptospiral surface, and thus, with the potential to participate in host–pathogen interactions (Nascimento *et al.*, 2004). Most of these proteins are annotated as hypothetical with no assigned function. By picking coding sequences from this pool of sequences, our group has cloned and expressed various proteins that were identified as novel leptospiral adhesins. Some of these proteins exhibited only laminin-binding property when screened against several individual ECM

components. These are as follows: Lsa27 (Longhi *et al.*, 2009), Lsa20 (Mendes *et al.*, 2011), Lsa25 and Lsa33 (Domingos *et al.*, 2012), and Lsa26 (Siqueira *et al.*, 2013). All these proteins are most probably surface-exposed, as assessed by indirect liquid-phase immunofluorescence or proteinase K accessibility. In addition to mediating ECM interactions through laminin, Lsa33, Lsa20, and Lsa26 are also plasminogen-interacting proteins and, hence, may participate to leptospiral invasiveness and dissemination (Mendes *et al.*, 2011; Domingos *et al.*, 2012). Moreover, Lsa25 and Lsa33 are capable to capture C4BP (Domingos *et al.*, 2012), a regulator of the classical pathway complement system, and may have a role in leptospiral immune evasion.

Adhesins with multiple ECM-binding profile

Several leptospiral adhesins with broader spectrum binding to ECM have been described. LipL53 and Lsa21 were reported to interact with laminin, collagen type IV, cellular and plasma fibronectin and are thought to have roles in pathogenesis and virulence of leptospires (Atzingen *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2010). Lsa21 and LipL53 share some similarities with the Lig proteins and hence are virulence factor candidates: their protein expression seems to be restricted to highly virulent low-passage strains (Matsunaga *et al.*, 2003; Atzingen *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2010). The gene encoding Lsa21 is restricted to pathogenic strains of *L. interrogans*, and the protein is upregulated at the transcriptional level by physiological osmolarity and temperature (Atzingen *et al.*, 2008).

Proteomics studies of *L. interrogans* have identified a protein encoded by the gene LIC10314 that is differentially expressed under virulence conditions (Vieira *et al.*, 2009). The recombinant protein, named Lsa63, was characterized as an adhesin that binds strongly to laminin and collagen type IV (Vieira *et al.*, 2010). The protein Lsa63 is highly conserved among pathogenic strains and absent in *L. biflexa*. This adhesin is probably expressed during infection because the protein is recognized by human leptospirosis serum samples, mostly at the convalescent phase of the disease.

The proteins encoded by the genes LIC11087, LIC11360, and LIC11975 were genome annotated as hypothetical and predicted to be surface-exposed. We have evaluated the recombinant proteins, named Lsa30, Lsa23, and Lsa36, respectively, and shown that they are also ECM-interacting proteins with the ability to mediate attachment to laminin and plasma fibronectin (Souza *et al.*, 2012; Siqueira *et al.*, 2013). Furthermore, the proteins Lsa23 and Lsa30 may interfere with the complement cascade by interacting with C4BP regulator, and in the

case of Lsa23, also with factor H. The proteins Lsa23, Lsa36, and Lsa30 are probably expressed during infection because antibodies present in serum samples of hamsters experimentally infected (Lsa30) or human leptospirosis sera (Lsa23 and Lsa36) can recognize these proteins. The OmpL1 has been described as a serological marker for the diagnosis of human leptospirosis and as a vaccine against the disease (Haake *et al.*, 1999; Natarajaseenivasan *et al.*, 2008). Although the gene is restricted to pathogenic serovars of *Leptospira*, its function is uncertain. Recently, it has been shown that OmpL1 has the ability to mediate attachment to laminin and plasma fibronectin. Like previously described adhesins, OmpL1 inhibited the binding of live *Leptospira* to the same ECM components (Fernandes *et al.*, 2012). These are versatile leptospiral adhesins that may play a role in mediating adhesion to hosts.

Also included in this category of multiple ECM binding are the adhesins OmpL37 (LIC12263) and OmpL47 (LIC13050; Pinne *et al.*, 2010), and the above discussed, LipL32, LigA/LigB and LenB, LenC, LenD, LenE, and LenF proteins (Table S1).

Lp95, an adhesin that activates cellular adhesion molecules

Cellular adhesion molecules (CAMs) are surface receptors present in eukaryotic cells that mediate cell–cell or cell–ECM interactions, and several microorganisms are reported to employ CAMs during their pathogenesis (Boyle & Finlay, 2003). The leptospiral proteins encoded by the genes LIC10365, LIC10507, LIC10508, and LIC10509 have been shown to be present in cellular infiltrate of liver and kidney of hamsters experimentally infected with virulent *L. interrogans*, suggesting that these proteins are expressed during infection. Most importantly, the recombinant proteins were capable of promoting the upregulation of ICAM-1 and E-selectin in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs; Vieira *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2008). Subsequently, we demonstrated for the first time that virulent *L. interrogans*, but also the saprophyte *L. biflexa*, induced an upregulation of CAMs in HUVECs, although the virulent one was more effective on activation (Atzingen *et al.*, 2009). Furthermore, the same work showed a novel leptospiral protein encoded by LIC12690, named Lp95 (leptospiral protein of 95 kDa), that is capable of specifically activating E-selectin in HUVECs. In addition to CAM induction, Lp95 binds to laminin and fibronectin, being the carboxy-terminal portion responsible for the interaction. Thus, Lp95 with its dual activities could act as a protein that contributes to leptospiral attachment to ECM and cell receptors during *Leptospira* infection (Atzingen *et al.*, 2009).

High-throughput screening microarrays

In addition to *in silico* identification of putative surface proteins and their production, such as recombinant proteins for the characterization of leptospiral ECM-binding proteins, recent work has employed high-throughput microarray strategy to identify novel host ligand-binding proteins (Pinne *et al.*, 2012). These studies have employed OMP microarray containing 401 leptospiral proteins expressed in a cell-free expression system. These cited authors identified 15 candidates as fibronectin-binding proteins, but only six of them were confirmed (Table S1). Among them, only LIC10258, called Lsa66, had been previously characterized as a fibronectin adhesin (Oliveira *et al.*, 2011). However, discrepancies between the array data and the published with purified recombinant proteins are evident. Several proteins with reported fibronectin adhesion properties were identified below the threshold, including the vastly studied LigA, LigB, and LipL32 and therefore admitted as nonbinding proteins (Pinne *et al.*, 2012). LigA and LigB showed an intermediate binding value, while LipL32 a low one. Interestingly, Lsa33, which was shown to bind uniquely to laminin (Domingos *et al.*, 2012), showed a binding value for fibronectin (*c.* 9.3) near the admitted threshold (10) (Pinne *et al.*, 2012). LIC13050 (OmpL47), detected by the same group as fibronectin-interacting protein, had a binding value below 0. The other proteins included in the same group are as follows: LipL53 (Oliveira *et al.*, 2010), Lsa21 (Atzingen *et al.*, 2008), Lp95 (Atzingen *et al.*, 2009), OmpL1 (Fernandes *et al.*, 2012), and all Len proteins (Stevenson *et al.*, 2007). Thus, although the array can rapidly identify ECM-binding proteins, the data will have to be further confirmed with the isolated proteins.

Concluding remarks

In recent years, major advances were made in the leptospiral field. Studies aiming to elucidate the pathogenesis of *Leptospira* based on available genome sequences, proteomics, and microarrays have been published, and the remarkable number of novel leptospiral ECM-interacting proteins recognized demonstrates this progress. This work assembles the current knowledge of leptospiral adhesins and describes their characterizations. These ECM-binding proteins are capable of mediating the attachment of *Leptospira* to mammalian hosts and of starting the process of invasion/colonization. Several laminin- and plasma fibronectin-binding proteins were identified indicating that leptospires have a redundant repertoire of adhesion molecules that are probably part of their invasion strategies. Proteins with exclusive or larger ligand capacity to

ECM were described. In addition, there are multifunctional proteins that exhibit binding activities toward several target proteins, such as plasminogen/plasmin and regulators of the complement system, and may have several tasks in leptospiral pathogenesis. The presence of multiple adherence proteins in pathogens such as *Yersinia* and *Neisseria* has been discussed in terms of compensation mechanisms or the need for cooperative action in adhesin–ligand interactions (Kline *et al.*, 2009; Mikula *et al.*, 2013). This redundancy may explain why mutants lacking virulence factors do not change their phenotypes and point out the heterologous expression of virulent proteins in the saprophyte, *L. biflexa* serovar Patoc, as an attractive model. *In vitro* studies using leptospiral recombinant proteins represent only a model to evaluate possible tasks of these novel proteins that no function could be assigned during genome annotation. However, it is possible that some of these proteins might be expressed only in small amounts in *Leptospira* and therefore could not perform these interactions. In any event, these ECM-binding proteins will have to be further investigated to gain information on their precise role in leptospiral pathogenesis. These studies should contribute to identify a multicomponent acellular vaccine in addition to potential targets for antimicrobial therapy that may help fight leptospirosis.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP, CNPq, and Fundacao Butantan, Brazil; MLV, MVA, RO, RFD, GHS, NMS, ARFT, and LGF have scholarships from FAPESP and CAPES (Brazil). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We thank Dr. A. Leyva for helpful discussion and with English editing of the manuscript. The authors report that they have no conflict of interest.

References

- Adler B & de la Pena Moctezuma A (2010) Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol* **140**: 287–296.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P (2007) *The Extracellular Matrix of Animals*. Garland Science, New York, NY.
- Atzingen MV, Barbosa AS, De Brito T *et al.* (2008) Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC Microbiol* **8**: 70.
- Atzingen MV, Gomez RM, Schattner M *et al.* (2009) Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. *J Infect* **59**: 264–276.
- Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO *et al.* (2006) A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infect Immun* **74**: 6356–6364.
- Boyle EC & Finlay BB (2003) Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 633–639.
- Breiner DD, Fahey M, Salvador R, Novakova J & Coburn J (2009) *Leptospira interrogans* binds to human cell surface receptors including proteoglycans. *Infect Immun* **77**: 5528–5536.
- Carvalho E, Barbosa AS, Gomez RM *et al.* (2009) Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. *FEBS Lett* **583**: 1381–1385.
- Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB *et al.* (2012) Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *J Infect Dis* **205**: 995–1004.
- Chaemchuen S, Rungpragayphan S, Poovorawan Y & Patarakul K (2011) Identification of candidate host proteins that interact with LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*, by random phage display peptide library. *Vet Microbiol* **153**: 178–185.
- Chagnot C, Listrat A, Astruc T & Desvaux M (2012) Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components. *Cell Microbiol* **14**: 1687–1696.
- Ching AT, Favaro RD, Lima SS *et al.* (2012) *Leptospira interrogans* shotgun phage display identified LigB as a heparin-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **427**: 774–779.
- Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J & Haake DA (2007) Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun* **75**: 2441–2450.
- Choy HA, Kelley MM, Croda J *et al.* (2011) The multifunctional LigB adhesin binds homeostatic proteins with potential roles in cutaneous infection by pathogenic *Leptospira interrogans*. *PLoS ONE* **6**: e16879.
- Confer AW & Ayalew S (2013) The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Vet Microbiol* **163**: 207–222.
- Croda J, Figueira CP, Wunder EA Jr, Santos CS, Reis MG, Ko AI & Picardeau M (2008) Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. *Infect Immun* **76**: 5826–5833.
- Domingos RF, Vieira ML, Romero EC, Goncalves AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA & Nascimento AL (2012) Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions. *BMC Microbiol* **12**: 50.
- Felix SR, Hartwig DD, Argondizzo AP *et al.* (2011) Subunit approach to evaluation of the immune protective potential

- of leptospiral antigens. *Clin Vaccine Immunol* **18**: 2026–2030.
- Fernandes LG, Vieira ML, Kirchgatter K *et al.* (2012) OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. *Infect Immun* **80**: 3679–3692.
- Figueira CP, Croda J, Choy HA, Haake DA, Reis MG, Ko AI & Picardeau M (2011) Heterologous expression of pathogen-specific genes ligA and ligB in the saprophyte *Leptospira biflexa* confers enhanced adhesion to cultured cells and fibronectin. *BMC Microbiol* **11**: 129.
- Gomez RM, Vieira ML, Schattner M *et al.* (2008) Putative outer membrane proteins of *Leptospira interrogans* stimulate human umbilical vein endothelial cells (HUVECS) and express during infection. *Microb Pathog* **45**: 315–322.
- Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J & Wagar EA (1999) Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun* **67**: 6572–6582.
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL *et al.* (2000) The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* **68**: 2276–2285.
- Hauk P, Macedo F, Romero EC, Vasconcellos SA, de Moraes ZM, Barbosa AS & Ho PL (2008) In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect Immun* **76**: 2642–2650.
- Hauk P, Barbosa AS, Ho PL & Farah CS (2012) Calcium binding to *Leptospira* outer membrane antigen LipL32 is not necessary for its interaction with plasma fibronectin, collagen type IV, and plasminogen. *J Biol Chem* **287**: 4826–4834.
- Hayes AJ, Lord MS, Smith SM, Smith MM, Whitelock JM, Weiss AS & Melrose J (2011) Colocalization *in vivo* and association *in vitro* of perlecan and elastin. *Histochem Cell Biol* **136**: 437–454.
- Hoke DE, Egan S, Cullen PA & Adler B (2008) LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect Immun* **76**: 2063–2069.
- Kline KA, Falker S, Dahlberg S, Normark S & Henriques-Normark B (2009) Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* **5**: 580–592.
- Koizumi N & Watanabe H (2003) Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiol Lett* **226**: 215–219.
- Lima SS, Ching AT, Favaro RD *et al.* (2013) Adhesin activity of *Leptospira interrogans* lipoprotein identified by *in vivo* and *in vitro* shotgun phage display. *Biochem Biophys Res Commun* **431**: 342–347.
- Lin YP & Chang YF (2008) The C-terminal variable domain of LigB from *Leptospira* mediates binding to fibronectin. *J Vet Sci* **9**: 133–144.
- Lin YP, Lee DW, McDonough SP, Nicholson LK, Sharma Y & Chang YF (2009) Repeated domains of *Leptospira* immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. *J Biol Chem* **284**: 19380–19391.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D & Darnell J (2000) *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman, New York, NY.
- Longhi MT, Oliveira TR, Romero EC, Goncalves AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA & Nascimento AL (2009) A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. *J Med Microbiol* **58**: 1275–1282.
- Malmstrom J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW & Aebersold R (2009) Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature* **460**: 762–765.
- Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J *et al.* (2003) Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol* **49**: 929–945.
- Matsunaga J, Sanchez Y, Xu X & Haake DA (2005) Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infect Immun* **73**: 70–78.
- McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG & Ko AI (2005) Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* **18**: 376–386.
- Mendes RS, Von Atzingen M, de Moraes ZM *et al.* (2011) The novel leptospiral surface adhesin Lsa20 binds laminin and human plasminogen and is probably expressed during infection. *Infect Immun* **79**: 4657–4667.
- Merien F, Truccolo J, Baranton G & Perolat P (2000) Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. *FEMS Microbiol Lett* **185**: 17–22.
- Mikula KM, Kolodziejczyk R & Goldman A (2013) Yersinia infection tools-characterization of structure and function of adhesins. *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 169.
- Muiznieks LD, Weiss AS & Keeley FW (2010) Structural disorder and dynamics of elastin. *Biochem Cell Biol* **88**: 239–250.
- Murray GL, Morel V, Cerqueira GM *et al.* (2009a) Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* **77**: 810–816.
- Murray GL, Srikram A, Hoke DE *et al.* (2009b) Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* **77**: 952–958.
- Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA *et al.* (2004) Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz J Med Biol Res* **37**: 459–477.
- Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sharma S, Sugunan AP, Selvin J & Sehgal SC (2008) Serodiagnosis of severe leptospirosis: evaluation of ELISA based on the recombinant OmpL1 or LipL41 antigens of *Leptospira*

- interrogans* serovar Autumnalis. *Ann Trop Med Parasitol* **102**: 699–708.
- Oliveira TR, Longhi MT, Goncalves AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA & Nascimento AL (2010) LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. *Microbes Infect* **12**: 207–217.
- Oliveira R, de Moraes ZM, Goncalves AP, Romero EC, Vasconcellos SA & Nascimento AL (2011) Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PLoS ONE* **6**: e21962.
- Palaniappan RU, Chang YF, Jusuf SS *et al.* (2002) Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* **70**: 5924–5930.
- Pinne M & Haake DA (2013) LipL32 is a subsurface lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies. *PLoS ONE* **8**: e51025.
- Pinne M, Choy HA & Haake DA (2010) The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. *PLoS Negl Trop Dis* **4**: e815.
- Pinne M, Matsunaga J & Haake DA (2012) Leptospiral outer membrane protein microarray, a novel approach to identification of host ligand-binding proteins. *J Bacteriol* **194**: 6074–6087.
- Ristow P, Bourhy P, da Cruz McBride FW *et al.* (2007) The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog* **3**: e97.
- Silva EF, Medeiros MA, McBride AJ *et al.* (2007) The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine* **25**: 6277–6286.
- Siqueira GH, Atzingen MV, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcellos SA & Nascimento AL (2013) Characterization of three novel adhesins of *Leptospira interrogans*. *Am J Trop Med Hyg* **89**: 1103–1116.
- Smith SG, Mahon V, Lambert MA & Fagan RP (2007) A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett* **273**: 1–11.
- Souza NM, Vieira ML, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcellos SA & Nascimento AL (2012) Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. *Microb Pathog* **53**: 125–134.
- Stevenson B, Choy HA, Pinne M *et al.* (2007) *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS ONE* **2**: e1188.
- Thomas DD & Higbie LM (1990) *In vitro* association of leptospire with host cells. *Infect Immun* **58**: 581–585.
- Tung JY, Yang CW, Chou SW, Lin CC & Sun YJ (2009) Calcium binds to LipL32, a lipoprotein from pathogenic *Leptospira*, and modulates fibronectin binding. *J Biol Chem* **285**: 3245–3252.
- Varki A, Cummings RD, Esko JD *et al.* (2009) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor, New York, NY.
- Verma A, Hellwage J, Artiushin S, Zipfel PF, Kraiczky P, Timoney JF & Stevenson B (2006) LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* **74**: 2659–2666.
- Verma A, Brissette CA, Bowman AA, Shah ST, Zipfel PF & Stevenson B (2010) Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infect Immun* **78**: 2053–2059.
- Vieira ML, D'Atri LP, Schattner M *et al.* (2007) A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett* **276**: 172–180.
- Vieira ML, Pimenta DC, de Moraes ZM, Vasconcellos SA & Nascimento AL (2009) Proteome analysis of *Leptospira interrogans* virulent strain. *Open Microbiol J* **3**: 69–74.
- Vieira ML, de Moraes ZM, Goncalves AP, Romero EC, Vasconcellos SA & Nascimento AL (2010) Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. *J Infect* **60**: 52–64.
- Yan W, Faisal SM, McDonough SP *et al.* (2009) Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. *Microbes Infect* **11**: 230–237.
- Yan W, Faisal SM, McDonough SP, Chang CF, Pan MJ, Akey B & Chang YF (2010) Identification and characterization of OmpA-like proteins as novel vaccine candidates for Leptospirosis. *Vaccine* **28**: 2277–2283.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Protein conservation, protein copy number per *Leptospira*, and differential expression in response to temperature, physiologic osmolarity and exposure to serum.

CAPÍTULO DE LIVRO EM REVISÃO - Mapeamento de genomas bacterianos: sequenciamento e funcional de leptospiros

Renan F. Domingos^{1,2} (doutorando), Gabriela H. Siqueira^{1,2} (doutorando), Luis G. Fernandes^{1,2} (doutorando), Aline R. F. Teixeira^{1,2} (doutorando), Lucas P. Silva¹ (mestrando), Maria R. Cosate¹ (pós-doc), Monica L. Vieira¹ (pós-doc) and Ana L. T. O. Nascimento^{1,2,*}

¹Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900, São Paulo, SP, Brazil; ²Programa Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil;

Resumo

Nos últimos anos, vimos assistindo avanços no desenvolvimento de novas vacinas devido a progressos na tecnologia de DNA recombinante e sequenciamento de DNA. O mapeamento de genomas completos, juntamente com o desenvolvimento da bioinformática, permitindo a mineração dos dados, impulsionou a genômica funcional. A revolução genômica, auxiliada pelas metodologias de vacinologia reversa (VR), microarranjos (transcriptômica) e proteômica, teve grande impacto no campo da microbiologia, sobretudo a voltada à área da Saúde. O uso dessas metodologias facilitou a identificação de novos candidatos vacinais de patógenos bacterianos importantes e, nesta busca, fatores de virulência e proteínas associadas à patogenicidade foram encontrados, que auxiliaram no entendimento dos patógenos em estudo. A VR aplicada ao genoma da *Neisseria meningitidis* sorogrupo B, bactéria responsável pela meningite meningocócica e sepsis, representa um marco na aplicação destas metodologias de ponta, e resultou na obtenção de uma vacina, em fase de registro final. A aplicação da VR no genoma da *Leptospira interrogans*, agente etiológico da leptospirose, encontra-se em andamento, e as principais metodologias e estratégias empregadas na busca de antígenos vacinais e fatores de virulência estão apresentadas neste capítulo.

Introdução

Doenças infecciosas representam um grande problema para a saúde pública, sobretudo em países em desenvolvimento. A prevenção destas doenças por meio de medidas profiláticas representa a melhor estratégia de intervenção. Entre os avanços nas condições de saneamento básico, educação, higiene e o uso de antimicrobianos, o maior impacto na melhoria das condições da saúde humana deve-se à vacinação. Doenças infecciosas que não dispõem de vacinas, doenças emergentes causadas por cepas resistentes a antimicrobianos, ou surgimento de novos patógenos demandam o desenvolvimento de novas estratégias vacinais de custo-efetivo.

Com os avanços das técnicas de DNA recombinante e sequenciamento, o antigo Instituto de Pesquisas Genômicas, TIGR-Institute for Genomic Research, em 1995, sequenciou o primeiro genoma completo de um organismo de vida livre, *Haemophilus influenza* [1]. A este, seguiram-se outros sequenciamentos completos de genoma, como o do patógeno causador da úlcera péptica, *Helicobacter pylori* [2] e o da espiroqueta causadora da doença de Lyme, *Borrelia burgdorferi* [3]. A era genômica havia iniciado, e com ela, o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática necessárias para auxiliar no entendimento do grande montante de dados gerados nestes projetos. A evolução na tecnologia promoveu uma

grande melhora e rapidez dos sequenciadores de DNA, diminuindo drasticamente o seu custo. Este fato propiciou o início do sequenciamento em larga escala ou pan-genômica. Atualmente, temos um total de 10.991 organismos sequenciados, com genoma completo ou não, entre procariotos, eucariotos e vírus, cujas sequências encontram-se disponíveis em bancos de dados públicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>).

A revolução genômica teve um grande impacto no campo da

microbiologia. O genoma completo, com suas sequências codificadoras de proteínas anotadas, através de servidores públicos na *web*, representa o potencial “proteômico” do organismo, fundamental para o seu entendimento. A investigação da regulação gênica, expressão de proteína e sua função, deu início à era pós-genômica, ou era “*omics*”, onde a genômica funcional, que inclui a transcriptômica, a proteômica e a vacinologia reversa (VR), tiveram papel fundamental (Figura 1).

Figura 1. Esquema das abordagens experimentais utilizando sequências genômicas.

Proteoma é o conjunto de proteínas expressas em uma célula ou tecido em determinadas situações. **Transcriptoma** é o conjunto completo de RNAs presente em uma célula ou tecido em determinadas situações. **Vacinologia Reversa** é uma tecnologia moderna aplicada à produção de vacinas, cujo objetivo principal é a identificação de alvos vacinais a partir das sequências genômicas de dado organismo.

Genomas, Patogênese e Vacinas

O sequenciamento completo do genoma da *N. meningitidis* sorogrupo B, principal agente etiológico da septicemia bacteriana e da meningite meningocócica [4], seguido da publicação que identificava candidatos vacinais a partir das sequências genômicas do meningococo sorogrupo B [5], representou um marco da genômica funcional aplicada ao desenvolvimento de vacinas. Outros

patógenos importantes tais como *Bacillus anthracis* [6], *Streptococcus pneumoniae* [7], *Staphylococcus aureus* [8, 9], *Chlamydia pneumoniae* [10], *Porphyromonas gingivalis* [11], *Edwardsiella tarda* [12], *Mycobacterium tuberculosis* [13], *L. interrogans* [14] e *Escherichia coli* uropatogênica [15] seguiram esta abordagem de explorar sequências genômicas na busca de candidatos vacinais. Esta metodologia, denominada de “Vacinologia Reversa”

– VR – por Rappuoli [16, 17] teve grande impacto no desenvolvimento de vacinas e na identificação de proteínas envolvidas na patogênese de microrganismos importantes. O primeiro patógeno onde a VR foi aplicada foi a *N. meningitidis* sorogrupo B – MenB – [5], para a qual não existe uma vacina protetora de amplo espectro. Este fato deve-se a presença de um polissacarídeo capsular muito semelhante a um antígeno de humanos (*self-antigen*) e a grande variabilidade de seus antígenos proteicos de superfície. A VR aplicada a MenB identificou três componentes proteicos empregados na formulação de uma vacina. São eles: antígeno de *Neisseria* que se liga a heparina (NHBA, do inglês, *Neisserial heparin-binding antigen*), uma proteína que se liga ao fator H (fHbp, do inglês, *factor H-binding protein*) e a adesina A de *Neisseria* (NadA, do inglês, *Neisserial adhesin A*) [18]. Estes três componentes parecem ter papel importante na virulência da MenB [19-22]. Analisando as características/funções destes antígenos, fica claro que a VR associada à bioinformática, enquanto seleciona antígenos candidatos vacinais, auxilia no entendimento da patogênese do organismo.

Semelhante ao ocorrido com a *N. meningitidis*, onde diversos fatores de virulência foram identificados, outros organismos importantes tiveram proteínas envolvidas na patogenidade encontradas durante a busca de alvos vacinais [18]. Com *Streptococcus* grupo A e B, formado por bactérias causadoras de sepsis e pneumonia, foram identificados antígenos com papel na adesão, colonização e formação de biofilme [23-25]. No caso da *E. coli*, responsável por infecção intestinal e extra intestinal (trato urinário, sepsis), antígenos de membrana externa, também com função na adesão e colonização, foram caracterizados [26, 27]. Patógenos como *S. aureus*, causador de pneumonia e endocardite [28], *Clostridium difficile*, responsável pela

diarreia nosocomial [29], e *Chlamydia trachomatis*, causador da gravidez ectópica e infertilidade [30], tiveram processo similar, com diversos antígenos/fatores de virulência envolvidos na motilidade, esporulação e interação patógeno-hospedeiro identificados.

Vacinologia Reversa versus estratégia convencional no desenvolvimento de vacinas bacterianas

A VR aplicada às sequências genômicas da *N. meningitidis* selecionou, através de ferramentas de bioinformática, novas proteínas que seriam potencialmente localizadas na superfície da bactéria ou exportadas à membrana. Seguiu-se uma clonagem em larga escala onde os “genes candidatos” foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*, PCR), clonados e as proteínas expressas. As proteínas obtidas foram empregadas para imunizar animais e os antissoros obtidos utilizados para diversos testes, incluindo teste bactericida [5]. Esta abordagem mostrou importantes vantagens sobre a metodologia convencional clássica, que requer o cultivo do microrganismo, obtenção do sedimento bacteriano, lise, purificação de proteínas ou inativação do organismo, testes de imunogenicidade em modelo animal, e ensaios de desafio ou bactericida, antes da seleção do antígeno candidato vacinal e do início dos testes clínicos. Um esquema comparativo entre as duas abordagens está apresentado na Figura 2.

Na VR, a bioinformática permite a identificação de proteínas, incluindo aquelas que são expressas em baixa quantidade ou mesmo mascarada por outro antígeno imunodominante. Esta metodologia também permite selecionar antígenos de patógenos de difícil cultivo em laboratório. O que se busca é a identificação de genes que potencialmente codificam fatores de virulência, proteínas secretadas ou associadas à membrana. Programas

públicos disponíveis em servidores da *web* utilizam algoritmos específicos para a identificação de novas proteínas

de superfície, que devido à localização, são potencialmente capazes de mediar resposta imune no hospedeiro.

Figura 2. Representação esquemática comparando as metodologias convencional e vacinologia reversa (VR) para a obtenção de vacinas bacterianas. Na metodologia convencional o patógeno de interesse é semeado em meio de cultura apropriado, e as células recuperadas através de centrifugação. O sedimento celular é inativado, lisado, e o sobrenadante, onde se encontram as proteínas, submetido a purificação por diversos processos de cromatografia para obtenção de proteínas purificadas. O processo de cromatografia selecionado vai depender das características da proteína em questão. Na vacinologia reversa o organismo é obtido de modo semelhante ao da metodologia convencional, e após a lise bacteriana o DNA genômico é extraído e submetido a técnica de sequenciamento. Na sequência de DNA os genes são identificados e selecionados de acordo com sua localização na célula por programas de bioinformática. Genes que codificam proteínas de membrana e de superfície são selecionados para clonagem e expressão da proteína. Proteínas obtidas por ambas metodologias são analisadas quanto a imunogenicidade *in vitro* ou *in vivo*, em modelo animal. Vantagens da VR em relação a convencional: (i) identificação de proteínas que são expressas em quantidades e muito pequenas, e, portanto de difícil obtenção; (ii) não há necessidade de cultivar o organismo para investigação de novas proteínas

Microarray ou microarranjo

Microarray ou técnica de microarranjo busca medir os níveis de expressão de transcritos em larga escala. O microarranjo de DNA consiste na imobilização de moléculas

de DNA, geralmente obtidas por PCR, a uma superfície sólida (*chip*). Os *chips* de DNA são utilizados para definir quais dos genes imobilizados estão transcricionalmente ativos em uma população celular em determinado

momento. Para isso, o RNA dessas células é extraído e é sintetizado o cDNA (fita de DNA complementar à fita de RNA). Esse último é marcado com fluoróforos e, finalmente, hibridizado com os fragmentos de DNA previamente imobilizados na superfície do *chip*. A partir de um detector de

fluorescência, os sinais emitidos por cada ponto quando há excitação por laser são medidos para quantificar a transcrição dos genes alvo imobilizados. A metodologia de microarranjos está esquematizada na Figura 3.

Figura 3. Esquema da metodologia de microarranjo com cDNA: (1) Isolamento do RNA de células-alvo do estudo; (2) A partir das amostras de RNA extraídas de diferentes tecidos é realizada a técnica de transcriptase reversa na presença de um fluoróforo produzindo as sondas de cDNA marcadas com fluorescência; (3) Hibridização com chips de DNA e medição da fluorescência; (4) Avaliação da atividade transcricional celular mediante realização de processamento e análises de imagem.

Chips de DNA carregando genomas bacterianos completos podem ser preparados, permitindo a análise da expressão de todo o repertório gênico. É uma ferramenta poderosa para a avaliação de genes diferencialmente expressos em resposta a estímulos e condições diversas. Grifantini e colaboradores [31], em 2002, foram os pioneiros na aplicação da transcriptômica para a identificação de candidatos vacinais, usando como modelo a *N. meningitidis*. Após a interação da bactéria com células humanas epiteliais, os RNAs isolados serviram como base para a identificação de genes bacterianos com

expressão diferencial durante esta interação. Foram capazes de reconhecer 347 genes com expressão diferencial, sendo que 189 sofreram regulação positiva. Desses, 40% dos genes codificam para proteínas de membrana, sugerindo que o contato com as células epiteliais promoveu uma substancial reorganização da membrana. Dentre as proteínas de membrana estimuladas por adesão, o grupo identificou 5 proteínas que foram capazes de induzir anticorpos bactericidas em camundongos, sendo promissores candidatos vacinais. O trabalho mostrou que o Microarranjo é uma técnica válida para a identificação

de candidatos vacinais. No entanto, a técnica tem algumas limitações já que não há, na maioria dos casos, correlação direta entre mRNA e o nível de expressão proteica, e esta metodologia não considera eventos regulatórios pós-transcricionais.

Proteômica

A proteômica é um campo de estudo que se propõe a análise do conjunto de proteínas expressas numa célula ou tecido, isto é, o proteoma. A elucidação da sequência genômica de um organismo é apenas o primeiro passo para entender sua biologia. A genômica prediz os quadros de leitura ou proteínas codificadas pelas sequências gênicas, denotando o estado estático de informações herdadas. O genoma não é suficiente para identificar quais proteínas estão sendo realmente expressas na célula em um dado momento e condição. Deste modo, a genômica alavancou a proteômica e facilitou a identificação das proteínas devido à criação de bancos de dados com as sequências codificadoras. Diferentemente do genoma, o proteoma é extremamente dinâmico, podendo ser afetado por condições

ambientais, temporais, nutricionais, entre outras [32].

Na proteômica, a técnica de eletroforese bidimensional (2DE) [33, 34] tem importante papel. Nesta técnica as proteínas são submetidas a duas etapas de separação: a primeira consiste em uma focalização isoeletrica na qual as proteínas são separadas pela sua carga elétrica; as proteínas migram até atingirem o pH em que possuam carga líquida igual à zero – o seu ponto isoeletrico (pI). A segunda etapa consiste na separação das proteínas de acordo com suas massas moleculares em eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). A separação 2DE atinge alto nível de resolução e permite a análise e visualização concomitante de centenas ou milhares de proteínas. A figura 4A ilustra a técnica da focalização isoeletrica (primeira dimensão) seguida da separação pela massa molecular (segunda dimensão); a figura 4B mostra uma eletroforese bidimensional (2D) obtida experimentalmente, após coloração das manchas (do inglês, “spots”) proteicos com prata.

Figura 4: Representação esquemática da técnica de eletroforese bidimensional (2DE). Após a solubilização das proteínas expressas na célula ou tecidos, essa amostra complexa é submetida a duas etapas de separação. **(A)** A primeira separação consiste em uma focalização isoelétrica, onde as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico. A segunda etapa separa as proteínas de acordo com suas massas moleculares em SDS-PAGE. **(B)** Após coloração do gel com um corante adequado, um mapa de pontos (spots) é visualizado. A análise desses spots é realizada por programas de computador.

Associada à técnica de 2DE, várias aplicações da espectrometria de massas (do inglês, *mass spectroscopy*, MS) desenvolveram-se extensivamente e emergiram como técnicas analíticas suficientemente sensíveis e compatíveis com as exigências da análise proteica em larga escala. A proteômica aplicada à microbiologia médica propiciou a caracterização de proteomas microbianos, estudo de mecanismos patogênicos de doenças infecciosas, identificação de novos alvos terapêuticos, análises de resistência a drogas, busca de novos marcadores moleculares e desenvolvimento vacinal. Em adição, a combinação da proteômica com análises sorológicas é uma técnica útil para a identificação de candidatos vacinais. O “imunoma” permite a identificação em larga escala dos

antígenos expostos na membrana, por exemplo, durante a infecção, que são reconhecidos por anticorpos dos hospedeiros. Essa abordagem foi utilizada para a identificação de candidatos vacinais contra *S. aureus*, quando proteínas de membrana foram resolvidas por 2DE, transferidas para membranas e incubadas com soros de pacientes infectados com a bactéria, identificando uma série de proteínas altamente imunorreativas e 15 candidatos vacinais em potencial [9]. Análises sorológicas do proteoma foram utilizadas para identificar proteínas imunorreativas de *B. anthracis* [35], *S. pneumoniae* [36], *S. iniae* [37], *M. tuberculosis* [38], *Haemophilus parasuis* [39], *Vibrio parahaemolyticus* [40], *Rickettsia heilongjiangensis* [41] entre outros.

Na era pós-genômica, as três principais estratégias descritas foram empregadas nos estudos com diversos patógenos importantes, buscando antígenos candidatos para desenvolvimento de vacinas [42]. Estudos com a *N. meningitidis* sorogrupo B utilizaram a genômica, microarranjos e proteômica [4, 5, 31, 43-45], enquanto que para a bactéria *S. pneumoniae*, a VR comparativa, proteômica e a metodologia clássica foram empregadas [7, 46-48]. Para outros organismos como *B. anthracis*, *S. aureus*, *M. tuberculosis*, *H. pylori*, foram empregadas a VR, imunoproteômica e proteoma de proteínas de superfície, para a identificação de antígenos vacinais [6, 9, 13, 49-58]. O desenvolvimento de vacinas com estes organismos encontra-se em diferentes fases de desenvolvimento indo desde a fase de identificação, testes pré-clínicos, clínicos à obtenção de registro [59].

Sequenciamento do genoma completo da bactéria *L. interrogans*

A leptospirose é uma zoonose de importância global, que nos últimos dez anos vem sendo considerada uma das principais doenças infecciosas emergentes. É causada por um grupo de bactérias patogênicas pertencentes à família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*.

A incidência de infecções humanas ocorre, principalmente em países tropicais e subtropicais onde as condições para transmissão são particularmente favoráveis. A contaminação ocorre por meio da exposição direta ou indireta via solo ou água contaminados com urina de mamíferos infectados cronicamente. Em áreas urbanas, os roedores domésticos, em particular o *Rattus norvegicus*, desempenham o papel de principal reservatório da doença, por permitirem a colonização das leptospiros nos túbulos renais proximais e as excretarem vivas através da urina. Em países desenvolvidos, é tida como doença recreacional e ocupacional, pois está

associada a atividades de lazer e de profissionais que trabalham em serviços de água e esgoto, canaviais, arrozais, lixeiros, tratadores de animais entre outras.

A leptospirose também tem grande importância econômica devido às alterações causadas em animais infectados, como gado, ovelha, etc., ocasionando diminuição drástica da produção de leite, alta incidência de abortos e morte precoce [60].

Os sintomas mais frequentes associados à doença variam desde uma infecção subclínica caracterizada por febre, calafrio, dores de cabeça e muscular, podendo até evoluir para formas mais severas como a síndrome de Weil [61] e a síndrome hemorrágica pulmonar (do inglês, *severe pulmonary hemorrhagic syndrome*, SPHS) [62]. Estas formas severas são responsáveis por cerca de 10% a 50% dos casos de mortalidade por leptospirose, principalmente em adultos entre 30-40 anos.

O tratamento com antibiótico é diferenciado dependendo da severidade da doença e duração dos sintomas, tornando-se efetivo quando iniciado na primeira semana de infecção. Devido à ausência de um diagnóstico precoce da doença, grande parte dos pacientes, quando diagnosticados, já apresentam as manifestações severas da mesma e o tratamento, nesta fase, atua apenas na redução da carga bacteriana, não revertendo as alterações patológicas estabelecidas. Dentre os antibióticos recomendados estão: ampicilina e amoxicilina, em casos onde não há relatos de complicações severas, penicilina G, para casos graves, e doxiciclina, tanto para profilaxia como doença branda, além da tetraciclina [60].

Na maioria dos casos, o diagnóstico laboratorial para leptospirose é feito por sorologia através do teste de microaglutinação (MAT) [60]. Embora este método apresente inúmeras desvantagens, tais como, baixa sensibilidade na detecção da fase inicial da doença, cultivo em laboratório

de diferentes sorovares, e difícil interpretação de resultados devido à reatividade cruzada, o teste é considerado "padrão ouro" para detecção de anticorpos nas amostras de soros de pacientes. É também considerado, até o presente momento, o teste mais apropriado para levantamentos epidemiológicos, além de ser o mais sensível e específico quando comparado com testes alternativos de diagnóstico sorológico [60, 63].

Acredita-se que a melhor estratégia para combater a doença é a adoção de medidas preventivas. O desenvolvimento de uma vacina é extremamente importante, dada a dificuldade de controlar roedores que são os principais disseminadores urbanos da doença. As primeiras vacinas testadas em animais e humanos, denominadas de bacterinas, são constituídas basicamente por uma suspensão de leptospiros inativadas por uma variedade de métodos, tais como aquecimento, formalina, fenol, irradiação, entre outros e, geralmente causam efeitos adversos [60]. Na tentativa de minimizar essas reações, novas preparações incluindo meio de cultura livre de proteínas, frações subcelulares ou preparações de membrana, demonstraram ser capazes de conferir uma resposta protetora através da indução de anticorpos contra lipopolissacarídeos (LPS) de leptospira [64]. Entretanto, essas vacinas apresentam algumas desvantagens, tais como: (i) proteção de curta duração, (ii) não indução de imunidade cruzada com outros sorovares não incluídos na preparação e (iii) a possível indução de autoimunidade [65].

Apesar das leptospiros terem sido identificadas há 100 anos [60], pouco se sabe sobre os mecanismos de invasão, patogenicidade e infecção deste organismo. Atualmente, temos dez genomas completos de leptospiros sequenciados: duas cepas de *L. interrogans* sorovar Lai, isolados 56601 e IPAV [66, 67], *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1- 130 [68,

69], duas cepas de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo, L550 e JB197 [70], *L. santarosai* sorovar Shermani cepa LT821 [71], duas cepas de *L. licerasiae*, VAR010 e MMD0835 [72] e duas cepas saprófitas, *L. biflexa*, Paris e Ames [73]. Dois cromossomas circulares caracterizam o genoma das leptospiros patogênicas, com tamanho variando de 3,9 a 4,6 Mb. O genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni forneceu novas perspectivas sobre a fisiologia relacionada ao metabolismo energético, tolerância a oxigênio, sistemas de transdução de sinal e mecanismos de patogenicidade. Adicionalmente, mais de 200 genes que codificam para lipoproteínas e proteínas de membrana externa foram identificados, considerados candidatos potenciais para o desenvolvimento de vacina contra a leptospirose.

A genômica comparativa entre as espécies patogênicas e saprófitas identificou genes únicos que podem ter papel na virulência. Em adição, genes hipotéticos ou hipotéticos conservados de função desconhecida parecem ser abundantes nas espécies patogênicas. O sequenciamento de genomas de leptospiros levou a um aumento significativo de publicações com diversos focos, aumentando o entendimento da biologia desta bactéria.

Vacinologia reversa aplicada ao genoma da *L. interrogans*

Com a disponibilidade das sequências genômicas de *Leptospira* deu-se o início de um projeto Piloto Funcional em larga escala. Este piloto empregou a estratégia da VR, selecionando as sequências codificadoras através do programa PSORT (<http://psort.hgc.jp/form.html>) [74] em proteínas expressas na membrana externa da bactéria e as não expostas. O programa PSORT identificou 2.000 sequências codificadoras como proteínas de superfície. O piloto funcional, com base em outros algoritmos, selecionou 437 proteínas, clonou 357 genes e 151 proteínas recombinantes foram

expressas no sistema hospedeiro *E. coli*. Foi possível sondar 100 destas proteínas com soro de pacientes positivos para leptospirose, sendo que 23 foram imunorreativas [14]. O

esquema resumindo a estratégia para a seleção das proteínas de membrana da bactéria *L. interrogans* sorovar Copenhageni durante o Piloto Funcional está mostrado na Figura 5.

Figura 5. Desenho esquemático do Piloto Genoma Funcional de *L. interrogans* para a identificação de candidatos vacinais por vacinologia reversa.

O piloto funcional mostrou que a estratégia da VR aplicada a *Leptospira* era viável e nos incentivou a prosseguir. Nosso grupo focou em proteínas de membrana externa conservadas nas cepas patogênicas. São estas proteínas que, provavelmente, estão envolvidas na interação das leptospirose com o ambiente externo, podendo também servir de alvo para o sistema imune do hospedeiro. Dentre estas proteínas, a classe das lipoproteínas é uma das mais importantes, sendo de grande interesse para o desenvolvimento de novas vacinas e diagnóstico [75]. Foram estabelecidos alguns critérios para a seleção das sequências

genômicas: ser de membrana externa, podendo ser ou não lipoproteína, ter peptídeo sinal de exportação à membrana, possuir ou não domínios conservados em fatores de virulência de outros patógenos, ser hipotética. O esquema da Figura 6 mostra os critérios de seleção adotados por nosso grupo de pesquisa.

O primeiro critério de seleção é a localização celular. Programas como PSORT [74] e CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw>) [76, 77] fazem a predição da localização com base na sequência de aminoácidos da proteína. Estas predições têm como base: (i) inferência com base na homologia/similaridade da sequência

em banco de dados, nos quais a localização das proteínas depositadas tenha sido experimentalmente investigada; (ii) ferramentas baseadas em sequências-sinal, cuja localização celular é conhecida. Seleccionamos as proteínas com predição de localização na membrana externa, incluindo as lipoproteínas. As proteínas com predição de localização no citoplasma são descartadas. Em seguida, utilizamos a ferramenta de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [78, 79] que verifica a presença ou não das proteínas no GenBank. No caso de haver similaridade com as sequências depositadas podemos verificar o quão conservadas são estas sequências em leptospiros e em outros organismos. Caso a proteína não tenha sido identificada ela é denominada hipotética, ou seja, é uma proteína nova. A presença de um peptídeo sinal de exportação ou exportação/lipidação,

no caso de lipoproteínas, é analisada pelos programas SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) [80] e LipoP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) [81], respectivamente. O primeiro algoritmo faz predição da presença de um peptídeo sinal de clivagem e exportação SpI (peptidase sinal I), enquanto o segundo prediz em adição ao SpI, o SpII (peptidase sinal II), que possui um sítio de clivagem e lipidação (do inglês, *lipobox*). A presença de domínios conservados é analisada via programa PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk>) [82], também por similaridade de sequência; a presença de alguns domínios conservados pode sinalizar se a proteína selecionada estaria envolvida na patogênese, caso este domínio esteja presente em proteínas caracterizadas com este papel.

Figura 6. Critérios e programas de bioinformática adotados para a seleção de genes a serem clonados e proteínas recombinantes a serem caracterizadas. GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; 1- PSORT: <http://psort.hgc.jp/form.html>; 2 - CELLO: <http://cello.life.nctu.edu.tw>; 3 -LipoP: <http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>; 4 - BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; 5 - PFAM: <http://pfam.sanger.ac.uk>

Clonagem dos genes selecionados e

expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*

As sequências correspondentes aos genes selecionados são amplificadas a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, utilizando oligonucleotídeos sintéticos complementares às sequências e sítios de restrição na fita *forward* e outro na fita *reverse*. Os fragmentos amplificados pela PCR são isolados do gel de agarose e purificados utilizando-se a metodologia de mini-preparação ou mini-prep [83]. Os insertos de DNA obtidos na PCR são clonados no vetor pGEM-Teasy (*Promega*®), para clonagem no sistema hospedeiro de *E. coli* e obtenção da proteína recombinante, ou em um vetor ponte (do inglês, *shuttle vector*) *E. coli*-mamífero, como o pTARGET, para obtenção de vacina de DNA.

O pGEM-T easy é um vetor linearizado, com uma timidina 3'-terminal em ambas as extremidades, o que permite a ligação dos produtos de PCR, onde uma sequência de poli-A é adicionada pela polimerase. A entrada do inserto de DNA no vetor interrompe a região codificadora da enzima β -galactosidase. Essa inativação permite a identificação dos clones recombinantes por seleção azul/branco em placas de meio de cultura/ágar, contendo ampicilina, IPTG e X-Gal, o qual é um substrato cromogênico que, quando degradado, torna-se azul; assim sendo, as bactérias que são incapazes de degradar esse substrato ficam brancas e são, presumivelmente, positivas para a presença do inserto de interesse.

A mistura de ligação dos produtos de PCR e pGEM-T easy é usada na transformação da linhagem *E. coli* DH5 α [83], previamente tornadas competentes pelo método do CaCl₂ (Figura 7A). As colônias recombinantes serão

selecionadas em meio contendo ampicilina. Para verificar a presença de inserto, são feitas preparações dos plasmídeos a partir das colônias positivas de *E. coli*. O DNA obtido é digerido com enzimas de restrição apropriadas e analisado em gel de agarose para observar a liberação do inserto de DNA do plasmídeo. Os clones positivos, resistentes a ampicilina, são sequenciados e os insertos contendo as sequências corretas de DNA são removidos por digestão com as enzimas de restrição específicas e subclonados no vetor de expressão pAE [84], nos mesmos sítios de restrição. O vetor pAE possui origem de replicação em *E. coli*, gene que confere resistência a ampicilina, um sítio de ligação ribossomal (do inglês, *ribosome binding site*, RBS), um códon de iniciação (ATG) seguido de sequência de 6 resíduos de histidinas e um sítio de múltipla clonagem. É um sistema de alta expressão, controlado pelo promotor do fago T7 e, portanto a expressão da proteína recombinante só ocorre na presença da T7 RNA polimerase (Figura 7B).

O vetor pTARGET (*Promega*®) é um vetor ponte, *E. coli*-mamífero, derivado do vetor pCI (*Promega*®). Contém origem de replicação em *E. coli*, gene que confere resistência a ampicilina, gene da β -galactosidase permitindo a seleção visual de colônias (azul e branca), promotor e sequência amplificadora (*enhancer*) de citomegalovírus (CMV) de mamífero para expressão constitutiva da proteína heteróloga, um íntron, um sítio de múltipla clonagem seguido de sequência de poliadenilação, sequência amplificadora, promotor de SV40 e um gene que confere resistência à neomicina seguido de sequência de poli (A) (Figura 7C).

Figura 8. Expressão e purificação da proteína recombinante para desenvolvimento de vacina proteica.

Caracterização das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes são avaliadas quanto à sua imunogenicidade em modelo animal, com o objetivo de avaliar a capacidade de indução de resposta imunológica, tanto humoral (produção de anticorpos), como celular (produção de citocinas). A capacidade das proteínas em reagir com soros humanos positivos para leptospirose nos dá ideia da expressão da mesma durante o processo de infecção por leptospirose e do potencial da mesma para compor um kit diagnóstico. Nosso grupo já identificou proteínas reativas com estes soros, inclusive na fase inicial da doença, na qual outros métodos são pouco eficazes.

A ligação de proteínas bacterianas a componentes da matriz extracelular (MEC) é a primeira etapa no processo de

invasão/colonização. Todas as proteínas recombinantes de *Leptospira* expressas em *E. coli* são avaliadas quanto a sua atividade de adesão. Componentes como laminina, fibronectina e colágeno são utilizados nestes ensaios. Até o momento, descrevemos 17 novas proteínas com atividade de adesão [88-101]. Reatividade a componentes de soro, como plasminogênio e reguladores do sistema complemento (como fator H e C4BP) também são avaliados. A ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio, um zimógeno circulante, nos dá uma ideia da participação da proteína no sistema fibrinolítico, com a geração da plasmina. A plasmina gerada na superfície das leptospirose é capaz de degradar laminina e fibronectina, podendo facilitar a invasão da bactéria no hospedeiro (FIGURA 9) [94-99, 102-104].

Figura 9. Representação esquemática básica da ativação da fibrinólise e inibição da coagulação seguido da ligação de plasminogênio (PLG) e fibrinogênio por *Leptospira*. As leptospiros capturam plasminogênio na sua superfície, que é convertido à plasmina por ativadores presentes no hospedeiro (uPA e tPA). A plasmina degrada diretamente componentes da matriz extracelular (laminina e fibronectina), facilitando a invasão bacteriana. A plasmina atua também na fibrinólise, degradando fibrina, o que por sua vez inibe a coagulação. As leptospiros capturam fibrinogênio livre através de seus receptores, resultando na sua depleção. Isso inibe a cascata de geração de coágulos de fibrina, catalisada pela trombina. Os triângulos verdes indicam os inibidores de enzimas e pró-enzimas: α2-antiplasmina e α2-macroglobulina atuando sobre a plasmina, inibidores de ativadores de plasminogênio (PAIs, do inglês *Plasminogen Activators Inhibitor*) inibindo a ação de uPA e tPA e antitrombina modulando a ação da trombina.

Identificamos uma proteína recombinante que se liga ao fator H e quatro ao C4BP [96, 98, 99]. *Leptospiras* patogênicas são capazes de evadir o sistema complemento, enquanto as não patogênicas ou saprófitas são eliminadas pelo hospedeiro [105]. Desse modo, a busca de proteínas que se ligam aos reguladores do sistema complemento é importante, pois as mesmas devem estar envolvidas na patogênese da bactéria e podem ser antígenos vacinais. Em patógenos importantes, como a *N. meningitidis*, proteínas que se ligam ao fator H do sistema complemento mostraram atividade bactericida e fazem parte da vacina contra meningite meningocócica, atualmente aguardando liberação por órgãos competentes na

Europa [106, 107]. O estudo da reatividade das proteínas recombinantes com componentes do soro identificou também, seis adesinas que se ligam ao fibrinogênio e inibem a formação de coágulo catalisada pela trombina (ver Figura 9) [108]. A leptospirose severa é acompanhada por múltiplos focos hemorrágicos cujo mecanismo é desconhecido. Nossos dados sugerem que estas proteínas podem mediar a interação de leptospiros com o fibrinogênio e podem auxiliar no entendimento da coagulopatia que acompanha a doença. Um sumário da caracterização das proteínas recombinantes está apresentado no esquema da Figura 10.

Figura 10. Esquema resumindo os principais estudos feitos para a caracterização das proteínas recombinantes de *Leptospira*.

Avaliação da atividade imunoprotetora das proteínas recombinantes - Ensaio de desafio em modelo animal

A atividade imunoprotetora das proteínas recombinantes é avaliada em ensaio de desafio em modelo animal. Hamsters são roedores susceptíveis às leptospiroses e empregados nestes experimentos. Estes são imunizados por inoculação subcutânea de 50 µg de proteína recombinante purificada ou vacina de DNA, vacina comercial (*Farrow Sure B*, Pfizer,) ou PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) solução salina, estes últimos utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. As suspensões para inoculação contêm hidróxido de alumínio 10%, empregado como adjuvante. São realizadas duas imunizações com intervalos de aproximadamente 15 dias. Antes de cada imunização, os animais são sangrados via plexo retro-orbital para termos controle do nível de anticorpos induzidos pós-inoculação das proteínas recombinantes. O título de anticorpos é analisado pela

técnica de ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

No 28º dia após a 1ª imunização, os animais são infectados por inoculação intraperitoneal com 200 µl de cultura de leptospiroses virulentas e um grupo controle recebe apenas meio de cultura. O esquema de imunização está apresentado na Figura 11. Após 21 dias de observação são contados os animais mortos e os sobreviventes são sangrados via plexo retro-orbital para avaliação do soro quanto à presença de anticorpos anti-leptospira pelo ensaio de MAT. Os rins dos animais sobreviventes são coletados, macerados, suspensos em solução salina nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} e inoculados em meio semi-sólido para avaliação da presença de leptospiroses, com o intuito de analisar atividade esterilizante do antígeno. Estes órgãos são também preservados para cortes e posterior análise histológica.

Figura 11. Esquema de imunização de *hamsters* (não está correto: hamster é hamster, porquinho-da-Índia é Guinéa-pig) com as proteínas recombinantes ou vacina de DNA e avaliação da resposta imunológica (anticorpos), imunoproteção (sobreviventes) e atividade esterilizante (presença de leptospiros em meio de cultura).

Identificamos algumas proteínas de leptospiros que induziram proteção parcial contra o desafio com leptospiros virulentos [109, 110]. É possível que a combinação de antígenos proteicos seja necessária para a obtenção de uma maior proteção, semelhante à vacina contra *N. meningitidis*, que emprega 4 proteínas antigênicas [111].

Conclusões

O rápido desenvolvimento nas técnicas de sequenciamento de DNA propiciou o início da era genômica, com o grande acúmulo de sequências de procariotos, vírus e eucariotos. A mineração destes dados, ou *data mining*, impulsionou o desenvolvimento da bioinformática, com seus algoritmos específicos para a predição das sequências genômicas, quanto a sua localização celular e possível função no organismo. Este processo deu início à era pós-genômica, ou "*omics*", onde as metodologias de transcriptômica e da proteômica tem importante papel. A genômica funcional, que engloba estas duas metodologias mais a VR, permitiu a identificação de proteínas envolvidas na patogenidade de patógenos importantes, durante a busca e caracterização de alvos vacinais. No caso da *N. meningitidis* sorogrupo B, uma vacina encontra-se em fase de licenciamento e vários patógenos encontram-se em fase de ensaios pré-clínicos e clínicos. A VR aplicada ao

genoma da *L. interrogans* permitiu a identificação de diversas proteínas com possível papel na patogênese, contribuindo para o conhecimento da leptospirose. Embora grandes desafios permaneçam, a evolução da genômica comparativa e da genômica sintética e estrutural como novas ferramentas, deve contribuir para a genômica funcional no desenvolvimento de futuras vacinas.

Agradecimentos. O laboratório de Biotecnologia Molecular II, do Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, tem apoio financeiro da FAPESP, CNPq e Fundação Butantan.

Referências Bibliográficas

1. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al.: **Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd.** *Science* 1995, **269**:496-512.
2. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC: **The complete genome sequence of the gastric pathogen**

- Helicobacter pylori.** *Nature* 1997, **388**:539-47.
3. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Wathley L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC: **Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*.** *Nature* 1997, **390**:580-6.
 4. Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE, Eisen JA, Ketchum KA, Hood DW, Peden JF, Dodson RJ, Nelson WC, Gwinn ML, DeBoy R, Peterson JD, Hickey EK, Haft DH, Salzberg SL, White O, Fleischmann RD, Dougherty BA, Mason T, Ciecko A, Parksey DS, Blair E, Cittone H, Clark EB, Cotton MD, Utterback TR, Khouri H, Qin H, Vamathevan J, Gill J, Scarlato V, Maignani V, Pizza M, Grandi G, Sun L, Smith HO, Fraser CM, Moxon ER, Rappuoli R, Venter JC: **Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58.** *Science* 2000, **287**:1809-15.
 5. Pizza M, Scarlato V, Maignani V, Giuliani MM, Arico B, Comanducci M, Jennings GT, Baldi L, Bartolini E, Capecchi B, Galeotti CL, Luzzi E, Manetti R, Marchetti E, Mora M, Nuti S, Ratti G, Santini L, Savino S, Scarselli M, Storni E, Zuo P, Broecker M, Hundt E, Knapp B, Blair E, Mason T, Tettelin H, Hood DW, Jeffries AC, Saunders NJ, Granoff DM, Venter JC, Moxon ER, Grandi G, Rappuoli R: **Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing.** *Science* 2000, **287**:1816-20.
 6. Ariel N, Zvi A, Grosfeld H, Gat O, Inbar Y, Velan B, Cohen S, Shafferman A: **Search for potential vaccine candidate open reading frames in the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO1: in silico and in vitro screening.** *Infect Immun* 2002, **70**:6817-27.
 7. Wizemann TM, Heinrichs JH, Adamou JE, Erwin AL, Kunsch C, Choi GH, Barash SC, Rosen CA, Masure HR, Tuomanen E, Gayle A, Brewah YA, Walsh W, Barren P, Lathigra R, Hanson M, Langermann S, Johnson S, Koenig S: **Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection.** *Infect Immun* 2001, **69**:1593-8.
 8. Etz H, Minh DB, Henics T, Dryla A, Winkler B, Triska C, Boyd AP, Sollner J, Schmidt W, von Ahsen U, Buschle M, Gill SR, Kolonay J, Khalak H, Fraser CM, von Gabain A, Nagy E, Meinke A: **Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:6573-8.
 9. Vytvytska O, Nagy E, Bluggel M, Meyer HE, Kurzbauer R, Huber LA, Klade CS: **Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis.** *Proteomics* 2002, **2**:580-90.
 10. Montigiani S, Falugi F, Scarselli M, Finco O, Petracca R, Galli G, Mariani M, Manetti R, Agnusdei M, Cevenini R, Donati M, Nogarotto R, Norais N, Garaguso I, Nuti S, Saletti G, Rosa D, Ratti G, Grandi G: **Genomic approach for analysis of surface proteins in *Chlamydia pneumoniae*.** *Infect Immun* 2002, **70**:368-79.
 11. Ross BC, Czajkowski L, Hocking D, Margetts M, Webb E, Rothel L, Patterson M, Agius C, Camuglia S, Reynolds E, Littlejohn T, Gaeta B, Ng A, Kuczek ES, Mattick JS, Gearing D, Barr IG: **Identification of vaccine candidate antigens from a genomic analysis of *Porphyromonas gingivalis*.** *Vaccine* 2001, **19**:4135-42.
 12. Srinivasa Rao PS, Lim TM, Leung KY: **Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis.** *Infect Immun* 2003, **71**:1343-51.
 13. Betts JC: **Transcriptomics and proteomics: tools for the identification of novel drug targets and vaccine candidates for tuberculosis.** *IUBMB Life* 2002, **53**:239-42.
 14. Gamberini M, Gomez RM, Atzingen MV, Martins EA, Vasconcellos SA, Romero EC, Leite LC, Ho PL, Nascimento AL: **Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis.** *FEMS Microbiol Lett* 2005, **244**:305-13.
 15. Alteri CJ, Hagan EC, Sivick KE, Smith SN, Mobley HL: **Mucosal immunization with iron receptor antigens protects against urinary tract infection.** *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000586.
 16. Rappuoli R: **Reverse vaccinology.** *Curr Opin Microbiol* 2000, **3**:445-50.
 17. Rappuoli R: **Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development.** *Vaccine* 2001, **19**:2688-91.
 18. Delany I, Rappuoli R, Seib KL: **Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013, **3**:a012476.
 19. Capecchi B, Adu-Bobie J, Di Marcello F, Ciocchi L, Maignani V, Taddei A, Rappuoli R,

- Pizza M, Arico B: **Neisseria meningitidis NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells.** *Mol Microbiol* 2005, **55**:687-98.
20. Madico G, Welsch JA, Lewis LA, McNaughton A, Perlman DH, Costello CE, Ngampasutadol J, Vogel U, Granoff DM, Ram S: **The meningococcal vaccine candidate GNA1870 binds the complement regulatory protein factor H and enhances serum resistance.** *J Immunol* 2006, **177**:501-10.
 21. Schneider MC, Exley RM, Chan H, Feavers I, Kang YH, Sim RB, Tang CM: **Functional significance of factor H binding to Neisseria meningitidis.** *J Immunol* 2006, **176**:7566-75.
 22. Serruto D, Spadafina T, Ciocchi L, Lewis LA, Ram S, Tontini M, Santini L, Biolchi A, Seib KL, Giuliani MM, Donnelly JJ, Berti F, Savino S, Scarselli M, Costantino P, Kroll JS, O'Dwyer C, Qiu J, Plaut AG, Moxon R, Rappuoli R, Pizza M, Arico B: **Neisseria meningitidis GNA2132, a heparin-binding protein that induces protective immunity in humans.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:3770-5.
 23. Manetti AG, Zingaretti C, Falugi F, Capo S, Bombaci M, Bagnoli F, Gambellini G, Bensi G, Mora M, Edwards AM, Musser JM, Graviss EA, Telford JL, Grandi G, Margarit I: **Streptococcus pyogenes pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation.** *Mol Microbiol* 2007, **64**:968-83.
 24. Bagnoli F, Moschioni M, Donati C, Dimitrovska V, Ferlenghi I, Facciotti C, Muzzi A, Giusti F, Emolo C, Sinisi A, Hilleringmann M, Pansegrau W, Censini S, Rappuoli R, Covacci A, Masignani V, Barocchi MA: **A second pilus type in Streptococcus pneumoniae is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells.** *J Bacteriol* 2008, **190**:5480-92.
 25. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW: **The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease.** *Nat Rev Microbiol* 2008, **6**:288-301.
 26. Moriel DG, Bertoldi I, Spagnuolo A, Marchi S, Rosini R, Nesta B, Pastorello I, Corea VA, Torricelli G, Cartocci E, Savino S, Scarselli M, Dobrindt U, Hacker J, Tettelin H, Tallon LJ, Sullivan S, Wieler LH, Ewers C, Pickard D, Dougan G, Fontana MR, Rappuoli R, Pizza M, Serino L: **Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic Escherichia coli.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:9072-7.
 27. Nesta B, Spraggon G, Alteri C, Moriel DG, Rosini R, Veggi D, Smith S, Bertoldi I, Pastorello I, Ferlenghi I, Fontana MR, Frankel G, Mobley HL, Rappuoli R, Pizza M, Serino L, Soriani M: **FdeC, a novel broadly conserved Escherichia coli adhesin eliciting protection against urinary tract infections.** *MBio* 2012, **3**:
 28. McCarthy AJ, Lindsay JA: **Genetic variation in Staphylococcus aureus surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions.** *BMC Microbiol* 2010, **10**:173.
 29. Lawley TD, Croucher NJ, Yu L, Clare S, Sebahia M, Goulding D, Pickard DJ, Parkhill J, Choudhary J, Dougan G: **Proteomic and genomic characterization of highly infectious Clostridium difficile 630 spores.** *J Bacteriol* 2009, **191**:5377-86.
 30. Heinz E, Tischler P, Rattei T, Myers G, Wagner M, Horn M: **Comprehensive in silico prediction and analysis of chlamydial outer membrane proteins reflects evolution and life style of the Chlamydiae.** *BMC Genomics* 2009, **10**:634.
 31. Grifantini R, Bartolini E, Muzzi A, Draghi M, Frigimelica E, Berger J, Ratti G, Petracca R, Galli G, Agnusdei M, Giuliani MM, Santini L, Brunelli B, Tettelin H, Rappuoli R, Randazzo F, Grandi G: **Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays.** *Nat Biotechnol* 2002, **20**:914-21.
 32. Bradshaw RA, Burlingame AL: **From proteins to proteomics.** *IUBMB Life* 2005, **57**:267-72.
 33. O'Farrell PH: **High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.** *J Biol Chem* 1975, **250**:4007-21.
 34. Klose J, Spielmann H: **Gel isoelectric focusing of mouse lactate dehydrogenase: heterogeneity of the isoenzymes A4 and X4.** *Biochem Genet* 1975, **13**:707-20.
 35. Ariel N, Zvi A, Makarova KS, Chitlaru T, Elhanany E, Velan B, Cohen S, Friedlander AM, Shafferman A: **Genome-based bioinformatic selection of chromosomal Bacillus anthracis putative vaccine candidates coupled with proteomic identification of surface-associated antigens.** *Infect Immun* 2003, **71**:4563-79.
 36. Ling E, Feldman G, Portnoi M, Dagan R, Overweg K, Mulholland F, Chalifa-Caspi V, Wells J, Mizrahi-Nebenzahl Y: **Glycolytic enzymes associated with the cell surface of Streptococcus pneumoniae are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse.** *Clin Exp Immunol* 2004, **138**:290-8.
 37. Shin GW, Palaksha KJ, Kim YR, Nho SW, Kim S, Heo GJ, Park SC, Jung TS: **Application of immunoproteomics in developing a**

- Streptococcus iniae vaccine for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, **849**:315-22.
38. Malen H, Softeland T, Wiker HG: **Antigen analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv culture filtrate proteins.** *Scand J Immunol* 2008, **67**:245-52.
 39. Zhou M, Zhang A, Guo Y, Liao Y, Chen H, Jin M: **A comprehensive proteome map of the *Haemophilus parasuis* serovar 5.** *Proteomics* 2009, **9**:2722-39.
 40. Li H, Ye MZ, Peng B, Wu HK, Xu CX, Xiong XP, Wang C, Wang SY, Peng XX: **Immunoproteomic identification of polyvalent vaccine candidates from *Vibrio parahaemolyticus* outer membrane proteins.** *J Proteome Res* 2010, **9**:2573-83.
 41. Qi Y, Xiong X, Wang X, Duan C, Jia Y, Jiao J, Gong W, Wen B: **Proteome analysis and serological characterization of surface-exposed proteins of *Rickettsia heilongjiangensis*.** *PLoS One* 2013, **8**:e70440.
 42. Bambini S, Rappuoli R: **The use of genomics in microbial vaccine development.** *Drug Discov Today* 2009, **14**:252-60.
 43. Bernardini G, Braconi D, Lusini P, Santucci A: **Post-genomics of *Neisseria meningitidis*: an update.** *Expert Rev Proteomics* 2011, **8**:803-11.
 44. Giuliani MM, Adu-Bobie J, Comanducci M, Arico B, Savino S, Santini L, Brunelli B, Bambini S, Biolchi A, Capecchi B, Cartocci E, Ciocchi L, Di Marcello F, Ferlicca F, Galli B, Luzzi E, Massignani V, Serruto D, Veggi D, Contorni M, Morandi M, Bartalesi A, Cinotti V, Mannucci D, Titta F, Ovidi E, Welsch JA, Granoff D, Rappuoli R, Pizza M: **A universal vaccine for serogroup B meningococcus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:10834-9.
 45. Dietrich G, Kurz S, Hubner C, Aepinus C, Theiss S, Guckenberger M, Panzner U, Weber J, Frosch M: **Transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* during infection.** *J Bacteriol* 2003, **185**:155-64.
 46. Seib KL, Zhao X, Rappuoli R: **Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology.** *Clin Microbiol Infect* 2012, **18 Suppl 5**:109-16.
 47. Hiller NL, Janto B, Hogg JS, Boissy R, Yu S, Powell E, Keefe R, Ehrlich NE, Shen K, Hayes J, Barbadora K, Klimke W, Dernovoy D, Tatusova T, Parkhill J, Bentley SD, Post JC, Ehrlich GD, Hu FZ: **Comparative genomic analyses of seventeen *Streptococcus pneumoniae* strains: insights into the pneumococcal supragenome.** *J Bacteriol* 2007, **189**:8186-95.
 48. Morscheck C, Prokhorova T, Sigh J, Pfeiffer M, Bille-Nielsen M, Petersen J, Boysen A, Kofoed T, Frimodt-Moller N, Nyborg-Nielsen P, Schrotz-King P: ***Streptococcus pneumoniae*: proteomics of surface proteins for vaccine development.** *Clin Microbiol Infect* 2008, **14**:74-81.
 49. Jagusztyn-Kryncka EK, Godlewska R: **New approaches for *Helicobacter* vaccine development--difficulties and progress.** *Pol J Microbiol* 2008, **57**:3-9.
 50. Glowalla E, Tosetti B, Kronke M, Krut O: **Proteomics-based identification of anchorless cell wall proteins as vaccine candidates against *Staphylococcus aureus*.** *Infect Immun* 2009, **77**:2719-29.
 51. DelVecchio VG, Sabato MA, Trichilo J, Dake C, Grewal P, Alefantis T: **Proteomics for the development of vaccines and therapeutics.** *Crit Rev Immunol* 2010, **30**:239-54.
 52. Giri PK, Kruh NA, Dobos KM, Schorey JS: **Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from *M. tuberculosis*-infected and culture filtrate protein-treated macrophages.** *Proteomics* 2010, **10**:3190-202.
 53. Read TD, Peterson SN, Tourasse N, Baillie LW, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Holtzapple EK, Okstad OA, Helgason E, Rilstone J, Wu M, Kolonay JF, Beanan MJ, Dodson RJ, Brinkac LM, Gwinn M, DeBoy RT, Madpu R, Daugherty SC, Durkin AS, Haft DH, Nelson WC, Peterson JD, Pop M, Khouri HM, Radune D, Benton JL, Mahamoud Y, Jiang L, Hance IR, Weidman JF, Berry KJ, Plaut RD, Wolf AM, Watkins KL, Nierman WC, Hazen A, Cline R, Redmond C, Thwaite JE, White O, Salzberg SL, Thomason B, Friedlander AM, Koehler TM, Hanna PC, Kolsto AB, Fraser CM: **The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria.** *Nature* 2003, **423**:81-6.
 54. Bergman NH, Anderson EC, Swenson EE, Janes BK, Fisher N, Niemeyer MM, Miyoshi AD, Hanna PC: **Transcriptional profiling of *Bacillus anthracis* during infection of host macrophages.** *Infect Immun* 2007, **75**:3434-44.
 55. Chitlaru T, Gat O, Grosfeld H, Inbar I, Gozlan Y, Shafferman A: **Identification of in vivo-expressed immunogenic proteins by serological proteome analysis of the *Bacillus anthracis* secretome.** *Infect Immun* 2007, **75**:2841-52.
 56. Jaing C, Gardner S, McLoughlin K, Mulakken N, Alegria-Hartman M, Banda P, Williams P, Gu P, Wagner M, Manohar C, Slezak T: **A functional gene array for detection of**

- bacterial virulence elements. *PLoS One* 2008, **3**:e2163.
57. Chakravarti DN, Fiske MJ, Fletcher LD, Zagursky RJ: **Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates.** *Vaccine* 2000, **19**:601-12.
 58. Utt M, Nilsson I, Ljungh A, Wadstrom T: **Identification of novel immunogenic proteins of *Helicobacter pylori* by proteome technology.** *J Immunol Methods* 2002, **259**:1-10.
 59. Snape MD, Philip J, John TM, Robinson H, Kelly S, Gossger N, Yu LM, Kittel C, Toneatto D, Dull PM, Pollard AJ: **Bactericidal antibody persistence 2 years after immunization with 2 investigational serogroup B meningococcal vaccines at 6, 8 and 12 months and immunogenicity of preschool booster doses: a follow-on study to a randomized clinical trial.** *Pediatr Infect Dis J* 2013, **32**:1116-21.
 60. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P: ***Leptospira* and Leptospirosis.** 1999,
 61. Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Mueller P, Kaslow DC: **Sporadic urban leptospirosis.** *Ann Intern Med* 1996, **125**:794-8.
 62. McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI: **Leptospirosis.** *Curr Opin Infect Dis* 2005, **18**:376-86.
 63. Levett PN: **Leptospirosis.** *Clin Microbiol Rev* 2001, **14**:296-326.
 64. de la Pena-Moctezuma A, Bulach DM, Kalambaheti T, Adler B: **Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis.** *FEMS Microbiol Lett* 1999, **177**:319-26.
 65. Rathnam SR, Rathnam S, Selvaraj S, Dean D, Nozik RA, Namperumalsamy P: **Uveitis associated with an epidemic outbreak of leptospirosis.** *Am J Ophthalmol* 1997, **124**:71-9.
 66. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG, Zhao GP: **Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing.** *Nature* 2003, **422**:888-93.
 67. Zhong Y, Chang X, Cao XJ, Zhang Y, Zheng H, Zhu Y, Cai C, Cui Z, Zhang Y, Li YY, Jiang XG, Zhao GP, Wang S, Li Y, Zeng R, Li X, Guo XK: **Comparative proteogenomic analysis of the *Leptospira interrogans* virulence-attenuated strain IPAV against the pathogenic strain 56601.** *Cell Res* 2011, **21**:1210-29.
 68. Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Digiampietri LA, Harstkeerl RA, Ho PL, Marques MV, Oliveira MC, Setubal JC, Haake DA, Martins EA: **Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni.** *Braz J Med Biol Res* 2004, **37**:459-77.
 69. Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MV, Oliveira MC, Menck CF, Leite LC, Carrer H, Coutinho LL, Degraive WM, Dellagostin OA, El-Dorry H, Ferro ES, Ferro MI, Furlan LR, Gamberini M, Gigliotti EA, Goes-Neto A, Goldman GH, Goldman MH, Harakava R, Jeronimo SM, Junqueira-de-Azevedo IL, Kimura ET, Kuramae EE, Lemos EG, Lemos MV, Marino CL, Nunes LR, de Oliveira RC, Pereira GG, Reis MS, Schrieffer A, Siqueira WJ, Sommer P, Tsai SM, Simpson AJ, Ferro JA, Camargo LE, Kitajima JP, Setubal JC, Van Sluys MA: **Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis.** *J Bacteriol* 2004, **186**:2164-72.
 70. Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK, Adler B: **Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:14560-5.
 71. Chou LF, Chen YT, Lu CW, Ko YC, Tang CY, Pan MJ, Tian YC, Chiu CH, Hung CC, Yang CW: **Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes.** *Gene* 2012, **511**:364-70.
 72. Ricaldi JN, Fouts DE, Selengut JD, Harkins DM, Patra KP, Moreno A, Lehmann JS, Purushe J, Sanka R, Torres M, Webster NJ, Vinetz JM, Matthias MA: **Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity.** *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**:e1853.
 73. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, Creno S, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC, McGrath A, Johnson MJ, Boursaux-Eude C, Seemann T, Rouy Z, Coppel RL, Rood JI, Lajus A, Davies JK, Medigue C, Adler B: **Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of**

- Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis.** *PLoS One* 2008, **3**:e1607.
74. Nakai K, Horton P: **PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization.** *Trends Biochem Sci* 1999, **24**:34-6.
 75. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA: **The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection.** *Infect Immun* 2000, **68**:2276-85.
 76. Yu CS, Lin CJ, Hwang JK: **Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions.** *Protein Sci* 2004, **13**:1402-6.
 77. Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK: **Prediction of protein subcellular localization.** *Proteins* 2006, **64**:643-51.
 78. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: **Basic local alignment search tool.** *J Mol Biol* 1990, **215**:403-10.
 79. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389-402.
 80. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H: **SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions.** *Nat Methods* 2011, **8**:785-6.
 81. Juncker AS, Willenbrock H, Von Heijne G, Brunak S, Nielsen H, Krogh A: **Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria.** *Protein Sci* 2003, **12**:1652-62.
 82. Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer EL, Eddy SR, Bateman A, Finn RD: **The Pfam protein families database.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**:D290-301.
 83. Sambrook J, Gething MJ: **Protein structure. Chaperones, paperones.** *Nature* 1989, **342**:224-5.
 84. Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL: **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* 2004, **37**:1103-9.
 85. Bhandari P, Gowrishankar J: **An Escherichia coli host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer.** *J Bacteriol* 1997, **179**:4403-6.
 86. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW: **Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes.** *Methods Enzymol* 1990, **185**:60-89.
 87. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-5.
 88. Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, Atzingen MV, Watanabe MM, Vieira ML, Morais ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin.** *Infect Immun* 2006, **74**:6356-64.
 89. Atzingen MV, Barbosa AS, De Brito T, Vasconcellos SA, de Morais ZM, Lima DM, Abreu PA, Nascimento AL: **Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection.** *BMC Microbiol* 2008, **8**:70.
 90. Atzingen MV, Gomez RM, Schattner M, Pretre G, Goncalves AP, de Morais ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells.** *J Infect* 2009, **59**:264-76.
 91. Longhi MT, Oliveira TR, Romero EC, Goncalves AP, de Morais ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **A newly identified protein of Leptospira interrogans mediates binding to laminin.** *J Med Microbiol* 2009, **58**:1275-82.
 92. Oliveira TR, Longhi MT, Goncalves AP, de Morais ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **LipL53, a temperature regulated protein from Leptospira interrogans that binds to extracellular matrix molecules.** *Microbes Infect* 2010, **12**:207-17.
 93. Vieira ML, de Morais ZM, Goncalves AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **Lsa63, a newly identified surface protein of Leptospira interrogans binds laminin and collagen IV.** *J Infect* 2010, **60**:52-64.
 94. Oliveira R, de Morais ZM, Goncalves AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **Characterization of novel OmpA-like protein of Leptospira interrogans that binds extracellular matrix molecules and plasminogen.** *PLoS One* 2011, **6**:e21962.
 95. Mendes RS, Von Atzingen M, de Morais ZM, Goncalves AP, Serrano SM, Asega AF, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **The novel leptospiral surface adhesin Lsa20 binds laminin and human plasminogen and is probably expressed during infection.** *Infect Immun* 2011, **79**:4657-67.
 96. Domingos RF, Vieira ML, Romero EC, Goncalves AP, de Morais ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **Features of two proteins of Leptospira interrogans with potential role in host-pathogen interactions.** *BMC Microbiol* 2012, **12**:50.

97. Fernandes LG, Vieira ML, Kirchgatter K, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Romero EC, Nascimento AL: **OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of Leptospira spp.** *Infect Immun* 2012, **80**:3679-92.
98. Souza NM, Vieira ML, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **Lsa30, a novel adhesin of Leptospira interrogans binds human plasminogen and the complement regulator C4bp.** *Microb Pathog* 2012, **53**:125-34.
99. Siqueira GH, Atzingen MV, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **Characterization of Three Novel Adhesins of Leptospira interrogans.** *Am J Trop Med Hyg* 2013. In press.
100. Fernandes LG, Vieira ML, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Romero EC, Nascimento AL: **Functional and immunological evaluation of two novel proteins of Leptospira spp.** *Microbiology* 2013. In press.
101. Vieira ML, Fernandes LG, Domingos RF, Oliveira R, Siqueira GH, Souza NM, Teixeira AF, Atzingen MV, Nascimento AL: **Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions.** *FEMS Microbiol Lett* 2013. In press.
102. Vieira ML, Vasconcellos SA, Goncalves AP, de Moraes ZM, Nascimento AL: **Plasminogen acquisition and activation at the surface of leptospira species lead to fibronectin degradation.** *Infect Immun* 2009, **77**:4092-101.
103. Vieira ML, Atzingen MV, Oliveira TR, Oliveira R, Andrade DM, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen Leptospira interrogans.** *PLoS One* 2010, **5**:e11259.
104. Vieira ML, Atzingen MV, Oliveira R, Mendes RS, Domingos RF, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **Plasminogen binding proteins and plasmin generation on the surface of Leptospira spp.: the contribution to the bacteria-host interactions.** *J Biomed Biotechnol* 2012, **2012**:758513.
105. Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M: **Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospire.** *Microb Pathog* 2005, **39**:139-47.
106. Pizza M, Donnelly J, Rappuoli R: **Factor H-binding protein, a unique meningococcal vaccine antigen.** *Vaccine* 2008, **26 Suppl 8**:I46-8.
107. Seib KL, Serruto D, Oriente F, Delany I, Adu-Bobie J, Veggi D, Arico B, Rappuoli R, Pizza M: **Factor H-binding protein is important for meningococcal survival in human whole blood and serum and in the presence of the antimicrobial peptide LL-37.** *Infect Immun* 2009, **77**:292-9.
108. Oliveira R, Domingos RF, Siqueira GH, Fernandes LG, Souza NM, Vieira ML, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **Adhesins of Leptospira interrogans mediate the interaction to fibrinogen and inhibit fibrin clot formation in vitro.** *PLoS Negl Trop Dis* 2013, **7**:e2396.
109. Atzingen MV, Goncalves AP, de Moraes ZM, Araujo ER, De Brito T, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with Leptospira interrogans.** *J Med Microbiol* 2010, **59**:1005-15.
110. Atzingen MV, Vieira ML, Oliveira R, Domingos RF, Mendes RS, Barros AT, Goncalves AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **Evaluation of immunoprotective activity of six leptospiral proteins in the hamster model of leptospirosis.** *Open Microbiol J* 2012, **6**:79-87.
111. Vogel U, Taha MK, Vazquez JA, Findlow J, Claus H, Stefanelli P, Caugant DA, Kriz P, Abad R, Bambini S, Carannante A, Deghmane AE, Fazio C, Frosch M, Frosi G, Gilchrist S, Giuliani MM, Hong E, Ledroit M, Lovaglio PG, Lucidarme J, Musilek M, Muzzi A, Oksnes J, Rigat F, Orlandi L, Stella M, Thompson D, Pizza M, Rappuoli R, Serruto D, Comanducci M, Boccadifuoco G, Donnelly JJ, Medini D, Borrow R: **Predicted strain coverage of a meningococcal multicomponent vaccine (4CMenB) in Europe: a qualitative and quantitative assessment.** *Lancet Infect Dis* 2013, **13**:416-25.

MANUSCRITO SUBMETIDO - Induction of boosted immune response in mice by leptospiral surface proteins expressed in fusion with DnaK

Marina V. Atzingen¹, Dunia Rodriguez¹, Gabriela Hase Siqueira^{1,2}, Luciana C. C. Leite^{1,2} and Ana L. T. O. Nascimento^{1,2*}.

¹Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900, São Paulo, SP, Brazil; ²Programa Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

ABSTRACT

Leptospirosis is an important global disease of human and veterinary concern. Caused by pathogenic *Leptospira*, the illness was recently classified as an emerging infectious disease. Currently available veterinarian vaccines do not induce long-term protection against infection and do not provide cross-protective immunity. Several studies have suggested the use of DnaK as an antigen in vaccine formulation, due to an exceptional degree of immunogenicity. We focused on four surface proteins: rLIC10368 (Lsa21), rLIC10494, rLIC12690 (Lp95) and rLIC12730, previously shown to be involved in host-pathogen interactions. Our goal was to evaluate the immunogenicity of the proteins genetically fused with DnaK in animal model. The chosen genes were amplified by PCR methodology and cloned into pAE, an *E. coli* vector. The recombinant proteins were expressed alone or in fusion with DnaK at the N-terminus. Our results demonstrate that leptospiral proteins fused with DnaK have elicited an enhanced immune response in mice when compared to the effect promoted by the individual proteins. The boosted immune effect was demonstrated by the production of total IgG, lymphocyte proliferation and significant amounts of IL-10 in supernatant of splenocyte cell cultures. We believe that this approach could be employed in vaccines to enhance presentation of antigens of *Leptospira* to professional immune cells.

INTRODUCTION

Leptospirosis is a widespread zoonosis caused by pathogenic *Leptospira* spp. that is transmitted from reservoir hosts to humans through water and soil contaminated with their urine [1]. In the urban settings, due to the disorganized growing population allied to the poor sanitation conditions and the increasing presence of brown rats, the disease has become a major health public problem. Symptoms of the disease include fever, vomiting, headache, diarrhea, abdominal and generalized muscle pain. Progression to multi-organ system complications, known as Weil's syndrome, occurs in 5-15% of cases, with mortality rates of 5-40% [2].

The best strategy to fight leptospirosis is through the implementation of prophylactic measures. However, available vaccines are the veterinarian ones, based on inactivated whole cell or membrane preparations of pathogenic leptospires. They confer protective responses frequently through the induction of antibodies against leptospiral lipopolysaccharide [1, 2]. These vaccines, however, do not induce long-term protection against infection and do not provide cross-protective immunity against leptospiral serovars not included in the vaccine preparation [3, 4]. Only Cuba and China have licensed vaccines for human, similar to the veterinarian ones. Due to the large number of leptospiral serovars, conserved and protective antigens are being pursued.

DnaK is a member of Hsp70 family that appears to play an important role in the innate and adaptative immune responses. It is involved in receptor-mediated antigen internalization by sentinel antigen-presenting cells (APCs), stimulation of production of various cytokines and maturation of dendritic cells [5]. Several studies have suggested the use of DnaK as an antigen in the formulation of vaccines, due to its high degree of immunogenicity (humoral and cellular) and the ability to stimulate T cells to produce IL10 [6-12].

By data mining the genome sequences of *L. interrogans* we have selected and characterized several leptospiral proteins as novel adhesins [13] and cellular adhesion molecules (CAM) inducers [14]. Among them were the adhesins Lsa21 [15], the C-terminus region of Lp95 [16], and two proteins rLIC12730 and rLIC10494 that had their immunogenic and immunoprotective activities evaluated in hamsters and have shown only modest performance [17].

Thus, we decided to take advantage of the HSP DnaK immunogenic properties and employ it to genetically combine with these four leptospiral genes LIC10368, LIC10494, LIC12730 and LIC12690. We aimed to evaluate if the fused DnaK-leptospiral proteins had their immunogenic activities boosted compared to the recombinant protein alone. We describe in this work, the in-frame cloning, protein expression and characterization of the DnaK-leptospiral recombinant fusion proteins and their immunogenic evaluation in mice.

MATERIAL AND METHODS

Cloning, expression and purification of recombinant proteins. Amplification of the CDSs was performed by PCR from total *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 genomic DNA using complementary primer pairs listed on Table 1.

PCR fragments were cloned into pGEM-T easy vector (Promega) and transformed into *E. coli* DH5 α subcloned into the pAE expression vector [18], that allow the

expression of recombinant proteins with a minimal 6 x His-tag at the N-terminus. DnaK gene (LIC10524) amplified with 2X (Gly-Pro) tag at C-terminus was cloned into pAE vector at BamHI and PvuII restriction sites, while the LIC10368, LIC10494, LIC12690 and LIC12730 genes were cloned into pAE vector at BamHI and NcoI restriction sites. For the DnaK genetically fused with LIC genes, in-frame cloning was obtained by digesting the pAE-LIC gene with PvuII and NcoI restriction sites and ligated into pAE-DnaK plasmid at the same restriction sites. The genetically fused DnaK-LIC genes will have a flexible hinge between DnaK and leptospiral genes [19]. All cloned sequences were confirmed by DNA sequencing with an ABI 3100 automatic sequencer (PE Applied Biosystems, Foster city, CA).

Protein expression was achieved in *E. coli* BL21 (SI) strain by the action of T7 DNA polymerase under control of the osmotically induced promoter *proU* [20]. *E. coli* BL21 (SI) containing recombinant plasmids were grown at 30 °C in Luria-Bertani (LB) broth without NaCl and with 100 μ g/mL ampicillin with continuous shaking until an optical density at 600 nm of 0.6 to 0.8 was reached. Recombinant protein synthesis was induced by the addition of 300 mM NaCl. After three hours, the cells were harvested by centrifugation, the bacterial pellets resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 100 μ g/mL of lysozyme, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 % Triton X-100). The bacterial cell pellets were lysed on ice with the aid of ultrasonic cell disruptor (Sonifier 450, Branson, USA). The bacterial lysate was centrifuged at 3,000 x g for 10 min at 4 °C. The pellets were resuspended in buffer containing 8 M urea; 20 mM Tris-HCl (pH8.0), 500 mM NaCl and 5 mM imidazol. The recombinant proteins were recovered from the insoluble fraction except rDnaK and rLIC12730 that were recovered from the soluble fraction. All proteins were purified through Ni²⁺-charged beads of chelating fast-flow chromatographic column (GE Healthcare). The insoluble proteins were refolded on-

column by gradually removing urea (8 - 0 M). The contaminants were washed away with low imidazol concentration and the recombinant proteins were eluted in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl and 500 mM imidazol. The efficiency of the purification was evaluated by 12 % SDS-PAGE. The purified recombinant protein were extensively dialyzed against PBS (pH 7.4) glycine solution (wt/vol: 0.1 %), at the proportion of 10 mL of protein per 1,000 mL of buffer, with at least five changes of buffer every 4 h for 48 h.

Circular Dichroism spectroscopy.

Recombinant proteins were dialyzed against sodium phosphate buffer (pH 7.4), except rLsa21 e rLp95 that were dialyzed against 100 mM Tris-HCl (pH 12.0), 500 mM NaCl. Circular dichroism (CD) spectroscopy measurements were performed at 20°C using a Jasco J-810 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan) equipped with a Peltier unit for temperature control. Far-UV CD spectra were measured using a 1 mm-path-length cell at 0.5 nm intervals. The spectra were presented as an average of five scans recorded from 185 to 260 nm. The residual molar ellipticity is expressed in degree X cm² per decimole. The data were submitted to CAPITO CD analysis program <http://capito.nmr.fli-leibniz.de/index.php> [21].

Mice immunization. Five female BALB/c mice (4–6 weeks old) were immunized subcutaneously with 10 µg of the recombinant proteins adsorbed in 10 % (vol/vol) of Alhydrogel (2 % Al(OH)₃, Brenntag Biosector, Denmark), used as adjuvant. Two subsequent booster injections were given at 2-week intervals with the same recombinant proteins preparation. Negative - control mice were injected with PBS plus Alhydrogel. Two weeks after each immunization, the mice were bled from the retro - orbital plexus to evaluate antibody response. The animals were then sacrificed to isolate splenocytes for lymphocyte proliferation and cytokine profiles in response to prime boosted antigen.

ELISA for detection of mouse IgG antibodies.

For isotype determination, total IgG (immunoglobulin G), IgG1 and IgG2a were measured by incubation of pooled mice sera with recombinant protein followed by incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse total IgG (1:5,000) or goat anti-mouse IgG1 or IgG2a (1:2,000) followed by incubation with HRP-conjugated anti-goat IgG (1:10,000). The optical density at 492 nm values exhibited by different dilution of mice sera were compared to a curve generated by coating the plates with different concentrations of mice total IgG, IgG1 or IgG2a.

Western blotting for identification of the proteins either alone or in fusion with DnaK.

Aliquots (1 µg) of each recombinant protein were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL; GE Healthcare). Membranes were blocked with 10% non-fat dried milk in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and then incubated with anti-DnaK-Lsa21, anti-DnaK-rLIC10494, anti-DnaK-Lp95 or anti-DnaK-rLIC12730 mouse serum, all at 1 : 20,000 dilution in 5% non-fat dried milk/PBS-T for 2 h at room temperature. After washing, the membrane was incubated with HRP-conjugated anti-mouse IgG (1 : 5,000; Sigma) in 5% non-fat dried milk/PBS-T for 1 h. The bands were revealed with ECL reagent kit chemiluminescence substrate (GE Healthcare).

Lymphoproliferation assay. At the end of the immunization protocols, BALB/c mice were sacrificed their spleens were aseptically removed and suspended in RPMI culture medium (Roswell Park Memorial Institute Medium-RPMI-1640 medium). Spleens were macerated and after erythrocytes lysis splenocytes were resuspended in 1 mL of RPMI containing 10 % fetal bovine serum and counted after staining with 0.4 % trypan blue for viability. Spleen cells (5 x 10⁵ cells / well) were plated in triplicate in a 96-well flat bottom cell culture plates (Costar, Corning). Spleen cells were stimulated with 5 µg/mL of Concanavalin A – Con A (Sigma),

employed as positive control, 5 µg/mL of recombinant protein, or culture medium alone, used as negative control. Cells were cultured for 48 h at 37 °C and 5 % CO₂ in a humidified atmosphere and proliferative rates were determined as a function of DNA synthesis, measured by the incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU) by BrdU ELISA colorimetric kit (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN) according to the manufacturer's instructions. Stimulation Index (S.I.) was calculated as the ratio between the mean OD of cells, from DnaK-leptospiral proteins immunized mice, stimulated with the same fusion proteins and the mean OD of cells from mice immunized with the protein, stimulated with the same leptospiral protein.

Cytokine production evaluation. For analysis of secreted cytokines, spleen cells from surface proteins and from DnaK fusion proteins immunized animals were isolated and cultured as described above, except that the culture was made in 24 well tissue culture plates, each well containing 5 x 10⁶ cells. After 48 h, cell-free culture supernatants were collected and stored for short-term at -20 °C. IL-4, IL-10, IFN-gamma and TNF-alpha were measured by ELISA (PreproTech) according to the manufacturer's instructions.

Ethics of animal experimentation. All animal studies were approved by the Ethic Committees of the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, under the protocol number 576/09. This Committee adopts the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation.

Statistical analysis. All results are expressed as means ± SD. Student's paired t-test was used to determine the significance of differences between means, and P < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Construction of genetically *in frame* fusion of DnaK with surface protein genes. The genes, DnaK, LIC10368,

LIC10494, LIC12730 and LIC12690, were amplified from *L. interrogans* serovar Copenhageni genomic DNA with complementary primers, designed with the restriction sequences at forward and reverse directions. Table 1 summarizes gene locus, recombinant protein given name, NCBI reference number, genome annotated protein function, sequence of the primers with the restriction cloning sites and predicted molecular mass of the individual recombinant protein. The genes were first individually cloned into pAE plasmid. The construction generated with pAE-DnaK allows the directional cloning of other guest DNA inserts in fusion at the carboxy-terminus of DnaK gene. The fused proteins have 6X His tag at N-terminus of DnaK and a flexible 2X (Gly-Pro) hinge region incorporated between the C-terminus of DnaK and the N-terminus of the selected gene. The hinge purposes to separate the two components of the protein fusion, thus allowing each to undergo folding without steric hindrance from the other [19]. The scheme of the expression cassettes of the constructs is depicted in Fig. 1A.

Expression and purification of recombinant proteins. Genetically combined proteins were successfully obtained and high expression level of recombinant proteins was achieved using the pAE vector and *E. coli* BL21 (SI) (Fig. 1B). DnaK and rLIC12730 proteins were expressed in a soluble form and purified from the supernatant. The other proteins were expressed in insoluble form, as inclusion bodies, and were purified after solubilization in 8M urea and on-column chromatography refolding on Ni²⁺-charged beads. The expected recombinant protein bands either individually or fused with DnaK are visualized by Commassie blue stained

SDS–12% PAGE and shown in Fig. 1B: DnaK (69 kDa - lane 1), rLIC10494 (25 kDa- lane 2), DnaK-rLIC10494 (93 kDa- lane 3), rLIC12730 (76 kDa- lane 4), DnaK-rLIC12730 (143 kDa - lane 5), Lsa21 (20 kDa- lane 6), DnaK-Lsa21 (87 kDa-lane 7), C-terminal portion of Lp95 (44 kDa- lane 8) and DnaK-Lp95 C-terminal (111 kDa- lane 9). Structural integrity of the purified proteins was assessed by circular dichroism (CD) spectroscopy. The method evaluates the secondary structure content of the protein and it is an important data to obtain after protein refolding. The CD spectrum of individually cloned and expressed protein and the spectrum of the corresponding fusion with DnaK are shown in Fig. 2A. Analysis of the spectrum data by CAPITO software is depicted in Fig. 2B, except for rLsa21 and Lp95 proteins that had their spectra badly resolved with very low absorption values. The data shows that DnaK, rLIC10494 and rLIC12730 secondary structure contents present a predominance of alfa-helix, the minima at 208 and 222 nm and the maxima at 192 nm. The DnaK fusion proteins have had their secondary structure contents shifted to alfa-helix, similar to the DnaK spectrum alone. CD spectrum of DnaK presented higher absorption values than the ones of the proteins alone and has, probably, superimposed the CD spectra of the leptospiral proteins.

Antibody response in mice immunized with the recombinant fused antigens. Total IgG antibody elicited in mice by t protein alone and fused with DnaK was analyzed using ELISA (Fig. 3A) and Western blotting (Fig. 3B). The DnaK and the leptospiral proteins were used to individually coat ELISA microplates. The immune sera from mice injected with the fusion proteins, DnaK-Lsa21, DnaK-

rLIC10494, DnaK-Lp95 C-terminal region and DnaK-rLIC12730 were employed to probe the respective coated protein. The ELISA data show that mice responded with IgG antibodies against both proteins (Fig. 3A). These results were strengthened by Western blotting data, which show that both blotted proteins are individually recognized by their corresponding mice antisera injected with the fusion proteins, excepted for the proteins Lsa21 (DnaK-Lsa21 - Fig. 3B, lane 2) and Lp95 C-terminal region (DnaK-Lp95- Fig. 3B, lane 4), where the place of the expected bands are indicated by symbols (*); Fig. 3B, lane 1 DnaK; lanes 3 and 5 show protein bands corresponding to rLIC10494, and rLIC12730, respectively.

Evaluation of total IgG and subclasses in sera of mice immunized with recombinant protein and DnaK fused proteins. In order to study the type of immune response triggered in mice by the individual DnaK, Lsa21, rLIC10494, Lp95 C-terminus region, rLIC12730 and the corresponding fusion proteins with DnaK, we performed the ELISA using subclass-specific antibodies IgG1 and IgG2a. The results show that DnaK alone elicits a strong statistically significant IgG immune response, with a predominance of IgG1 (Fig. 4), when compared to PBS-immunized control (data not shown). Lsa21 alone was not able to induce an efficient immune response in mice, but the DnaK-Lsa21 protein had an improved, statistically significant production of both IgG total and IgG2a subclass, when compared to Lsa21 alone (Fig. 4). Analysis of proteins rLIC10494, Lp95 C-terminus and rLIC12730 alone with its DnaK fusion showed an increase, statistically significant titer values of total IgG. The values obtained with IgG subclasses were not statistically significant.

Evaluation of lymphocyte proliferation in spleen cells of mice immunized with recombinant proteins.

To evaluate the effect of proteins in fusion with DnaK on the cellular immune response of the recombinant protein alone, mice were immunized with the recombinant proteins, individually or in fusion with DnaK. Spleens from PBS-injected mice were employed as controls. Lymphocyte proliferation showed an increased, boosted effect when animals were immunized with fusion proteins compared with leptospiral proteins alone (Fig. 5). In all cases, but remarkably with DnaK-rLIC12730, an improvement was observed when animals were primed and stimulated with proteins in fusion with DnaK (Fig. 5), having a stimulation index of 8.72. DnaK-Lsa21, DnaK-rLIC10494 and DnaK-Lp95 C-terminus showed stimulation index of 4.89, 2.25 and 4.09, respectively. High proliferation level was obtained when cells were treated with ConA, employed as positive control of the experiment (not shown). Addition of proteins, either alone or in fusion with DnaK to lymphocytes from animals that have not been primed with either proteins or the corresponding DnaK fusions, produced non-significant levels of proliferation (data not shown).

Cytokine production evaluation in splenocytes of mice immunized with recombinant proteins.

In order to assess secreted cytokines, supernatants of cultured spleen cells from recombinant proteins immunized mice were analyzed for the presence of IL-10, IL-4, IFN- γ and TNF- α , selected to discriminate cellular-Th1 (IFN- γ and TNF- α) and humoral-Th2 (IL-10 and IL-4) immune responses [22, 23]. Recombinant proteins Lsa21 and Lp95 C-terminal were not capable

to promote secretion of IL-10 and the amount detected were similar to the controls (Fig. 6A). Proteins rLIC10494 and rLIC12730, alone, induced small amounts of IL-10, statistically significant compared to the controls (cell culture medium). A booster effect was elicited by the presence of DnaK in the protein fusions, being statistically significant with the proteins Lsa21, rLIC10494 and C-terminus of Lp95. The presence of DnaK does not promote an enhancement on IFN-gamma level, and in the case of rLIC12730, a decreased the amount of IFN-gamma detected. Measurements of the same parameters with spleen cells from control animals immunized with medium either stimulated or not with the recombinant proteins produced negligible results (not shown). Cytokines IL-4, and TNF-alfa evaluation resulted in very low values (not shown).

DISCUSSION

Heat shock proteins (HSPs) are a large family of proteins with diverse molecular mass and intracellular localizations. These proteins assume important functions in maintaining cell homeostasis, and they have, therefore, been conserved during evolution. Under physiological conditions, some of these proteins operate as intracellular molecular chaperones. Chaperones take part in the assembly, stabilization, folding, and translocation of oligomeric proteins. The expression of many HSPs is upregulated under stress conditions, nutritional deficiencies, ultraviolet irradiation, chemicals, viral infection, and ischemia-reperfusion injury [24, 25]. Chaperones, like bacterial DnaK and GroEI, have been reported to decrease recombinant protein aggregates and to assist their folding in *E. coli* host expression systems [26, 27]. In our

studies, only DnaK and rLIC12730 were expressed in their soluble form. However, after refolding, all fusion proteins have their secondary structure contents well defined, consistent with the chaperone activity due to the presence of DnaK.

HSPs have immunological functions: they are highly immunogenic in BALB/c mice and recombinant complexes of antigens with DnaK have been reported to be CD8⁺ T-cell-stimulating immunogens [11, 28]. Studies performed with *Mycobacterium tuberculosis* heat shock fusion protein have shown to increase delivery and cross-processing by B lymphocytes, which could represent a new contribution to the generation of CD8⁺ T-cell responses [24].

It has been demonstrated that pathogenic leptospires can elicit Th1 response together with anti-lipopolsaccharide antibodies in animal model [29]. OmpL1 and LipL41 combined B and T cell epitopes can promote a Th1 immune response in BALB/c mice [30]. We have previously shown that OmpL1 of *L. interrogans* stimulated both Th1 and Th2 immune response in BALB/c mice [31]. More recently, we have reported that two leptospiral adhesins, Lsa44 and Lsa45, were capable of inducing a combination of humoral and cellular immune response in mice, characterized by high concentration of antibodies, induction of cellular lymphoproliferation and increased level of cytokines [32].

We have previously characterized four leptospiral proteins that we have expressed in *E. coli* system. Two of them were described as novel adhesins, Lsa21 and Lp95 C-terminus region [15, 16], and the other two, rLIC10494 and rLIC12730, were shown to have a modest effect in immunoprotection studies [17]. The leptospiral genes, DnaK, LIC10368,

LIC10494, LIC12730 and LIC12690, were genetically cloned in fusion with DnaK. The DnaK-leptospiral fusion proteins, as well as, the proteins alone, were employed to immunize mice. The presence of DnaK in fusion with the leptospiral proteins Lsa21, rLIC10494, Lp95 C-terminus and rLIC12730 promoted a boosted effect on their immunogenic activities either at humoral or cellular level, as denoted by an enhancement of total IgG production, induction of cellular lymphocyte proliferation and IL-10 increased levels in BALB/c mice. This improved effect is particularly evident with the recombinant Lsa21, a protein that has been previously shown to be present only in low passage, virulent strain of *Leptospira*, with a possible role in pathogenesis [15]. Similar to the data we have previously obtained with the adhesin Lsa44 of *Leptospira* [32], these fusion proteins did not induce either TNF-alfa or IL-4. IL-10 was described to have a special role in restraining and preventing an excessive immune response and collateral damage [33]. In the case of leptospirosis, it was observed that the induction of IL-10 is higher in mice than in hamsters animal model, consistent with the chronically, asymptomatic of this model [34].

Taken together, our data show that leptospiral proteins in fusion with DnaK promoted an enhanced cellular and humoral immune response in mice. HSPs, such as prokaryotic DnaK, incorporated to antigens to boost their immunological properties, have potential advantages for use in vaccine development against leptospirosis.

Acknowledgement. This work was supported by FAPESP, CNPq and Fundacao Butantan, Brazil; MVA and GHS have fellowships from FAPESP.

REFERENCES

1. P. N. Levett, "Leptospirosis," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 14, no. 2, pp. 296-326, 2001.
2. S. Faine, B. Adler, C. Bolin, and P. Perolat, *Leptospira and Leptospirosis*, MediSci, Melbourne, Australia, 2nd edition, 1999.
3. C. A. Bolin, A. B. Thiermann, A. L. Handsaker, and J. W. Foley, "Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis infection of pregnant cattle," *American Journal of Veterinary Research*, vol. 50, no. 1, pp. 161-165, 1989.
4. C. A. Bolin, R. L. Zuerner, and G. Trueba, "Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis in bovine urine," *American Journal of Veterinary Research*, vol. 50, no. 7, pp. 1001-1003, 1989.
5. J. Radons and G. Multhoff, "Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70," *Exercise Immunology Review*, vol. 11, pp. 17-33, 2005.
6. A. A. Tobian, D. H. Canaday, W. H. Boom, and C. V. Harding, "Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages," *The Journal of Immunology*, vol. 172, no. 9, pp. 5277-5286, 2004.
7. A. A. Tobian, D. H. Canaday, and C. V. Harding, "Bacterial heat shock proteins enhance class II MHC antigen processing and presentation of chaperoned peptides to CD4+ T cells," *The Journal of Immunology*, vol. 173, no. 8, pp. 5130-5137, 2004.
8. W. van Eden, A. Koets, P. van Kooten, B. Prakken, and R. van der Zee, "Immunopotentiating heat shock proteins: negotiators between innate danger and control of autoimmunity," *Vaccine*, vol. 21, no. 9-10, pp. 897-901, 2003.
9. A. R. Lussow, C. Barrios, J. van Embden et al., "Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules," *European Journal of Immunology*, vol. 21, no. 10, pp. 2297-2302, 1991.
10. R. Al-Attayah, N. Madi, A. S. El-Shamy, H. Wiker, P. Andersen, and A. Mustafa, "Cytokine profiles in tuberculosis patients and healthy subjects in response to complex and single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*," *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol. 47, no. 2, pp. 254-261, 2006.
11. A. Wieland, M. Denzel, E. Schmidt et al., "Recombinant complexes of antigen with stress proteins are potent CD8 T-cell-stimulating immunogens," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 86, no. 9, pp. 1067-1079, 2008.
12. C. Barrios, C. Tougne, B. S. Polla, P. H. Lambert, and G. Del Giudice, "Specificity of antibodies induced after immunization of mice with the mycobacterial heat shock protein of 65 kD," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 98, no. 2, pp. 224-228, 1994.
13. M. L. Vieira, L. G. Fernandes, R. F. Domingos et al., "Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions," *FEMS Microbiology Letters*, 2013.
14. M. L. Vieira, L. P. D'Atri, M. Schattner et al., "A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 276, no. 2, pp. 172-180, 2007.
15. M. V. Atzingen, A. S. Barbosa, T. De Brito et al., "Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection," *BMC Microbiology*, vol. 8, pp. 70, 2008.
16. M. V. Atzingen, R. M. Gomez, M. Schattner et al., "Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells," *Journal of Infection*, vol. 59, no. 4, pp. 264-276, 2009.
17. M. V. Atzingen, A. P. Goncalves, Z. M. de Moraes et al., "Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with *Leptospira interrogans*," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 59, no. Pt 9, pp. 1005-1015, 2010.
18. C. R. Ramos, P. A. Abreu, A. L. Nascimento, and P. L. Ho, "A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 37, no. 8, pp. 1103-1109, 2004.
19. O. G. Gomez-Duarte, J. Galen, S. N. Chatfield, R. Rappuoli, L. Eidels, and M. M. Levine, "Expression of fragment C of tetanus toxin fused to a carboxyl-terminal fragment of diphtheria toxin in *Salmonella typhi* CVD 908 vaccine strain," *Vaccine*, vol. 13, no. 16, pp. 1596-1602, 1995.

20. P. Bhandari and J. Gowrishankar, "An Escherichia coli host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer," *Journal of Bacteriology*, vol. 179, no. 13, pp. 4403-4406, 1997.
21. C. Wiedemann, P. Bellstedt, and M. Grolach, "CAPITO--a web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data," *Bioinformatics*, vol. 29, no. 14, pp. 1750-1757, 2013.
22. T. Storni, T. M. Kundig, G. Senti, and P. Johansen, "Immunity in response to particulate antigen-delivery systems," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 3, pp. 333-355, 2005.
23. J. M. Reed, P. J. Branigan, and A. Bamezai, "Interferon gamma enhances clonal expansion and survival of CD4+ T cells," *Journal of Interferon & Cytokine Research*, vol. 28, no. 10, pp. 611-622, 2008.
24. A. A. Tobian, C. V. Harding, and D. H. Canaday, "Mycobacterium tuberculosis heat shock fusion protein enhances class I MHC cross-processing and -presentation by B lymphocytes," *The Journal of Immunology*, vol. 174, no. 9, pp. 5209-5214, 2005.
25. N. Strbo and E. R. Podack, "Secreted heat shock protein gp96-Ig: an innovative vaccine approach," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 59, no. 5, pp. 407-416, 2008.
26. A. Haacke, G. Fendrich, P. Ramage, and M. Geiser, "Chaperone over-expression in Escherichia coli: apparent increased yields of soluble recombinant protein kinases are due mainly to soluble aggregates," *Protein Expression and Purification*, vol. 64, no. 2, pp. 185-193, 2009.
27. R. S. Gupta, N. B. Ramachandra, T. Bowes, and B. Singh, "Unusual cellular disposition of the mitochondrial molecular chaperones Hsp60, Hsp70 and Hsp10," *Novartis Foundation Symposia*, vol. 291, pp. 59-68; discussion 69-73, 137-140, 2008.
28. K. Sinha and R. Bhatnagar, "GroEL provides protection against Bacillus anthracis infection in BALB/c mice," *Molecular Immunology*, vol. 48, no. 1-3, pp. 264-271, 2010.
29. F. Vernel-Pauillac and F. Merien, "Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of Leptospira interrogans," *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 7, pp. 4172-4179, 2006.
30. X. Lin, A. Sun, P. Ruan, Z. Zhang, and J. Yan, "Characterization of conserved combined T and B cell epitopes in Leptospira interrogans major outer membrane proteins OmpL1 and LipL41," *BMC Microbiology*, vol. 11, no. 1, pp. 21, 2011.
31. L. G. Fernandes, M. L. Vieira, K. Kirchgatter et al., "OmpL1 Is an Extracellular Matrix- and Plasminogen-Interacting Protein of Leptospira spp," *Infection and Immunity*, vol. 80, no. 10, pp. 3679-3692, 2012.
32. L. G. Fernandes, M. L. Vieira, I. J. Alves et al., "Functional and immunological evaluation of two novel proteins of Leptospira spp," *Microbiology*, vol. 160, no. Pt 1, pp. 149-164, 2014.
33. R. Sabat, G. Grutz, K. Warszawska et al., "Biology of interleukin-10," *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 21, no. 5, pp. 331-344, 2010.
34. M. Matsui, V. Rouleau, L. Bruyere-Ostells, and C. Goarant, "Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice," *Infection and Immunity*, vol. 79, no. 11, pp. 4480-4492, 2011.

Legends to Figures

Figure 1. (A) Schematic representation of the expression cassettes. The genetically fused genes were obtained from individually cloned genes in pAE vector, and then, surface protein genes were digested at PvuII / NcoI restriction sites and ligated in the same sites into pAE-DnaK construct. Depicted are: T7 phage RNA polymerase promoter, ribosome-binding site (RBS), ATG start codon, 6 X Histidine tag, restriction cloning sites and the 2X (Gly-Pro) flexible hinge. **(B) Analysis of purified recombinant proteins by SDS-PAGE.** Purified recombinant protein eluted from Ni²⁺-charged Sepharose column with 1 M imidazole are visualized by Coomassie blue staining. Lane H (HMW) and L (LMW), high and low molecular mass protein markers; In kDa: lane 1, DnaK (68.9); lane 2, rLIC10494 (25.1); lane 3, DnaK-rLIC10494 (92.5); lane 4, rLIC12730 (75.7); lane 5, DnaK-rLIC12730 (143.1); lane 6, Lsa21 (19.8); lane 7, DnaK-Lsa21 (87.2); lane 8, Lp95 C-terminal (43.6); lane 9, DnaK-Lp95 C-terminal (110.9).

Figure 2. CD spectra of purified recombinant proteins depicted after refolding. (A) CD spectra (FAR-UV CD) of 10 μ M of each recombinant protein in 10 mM Na-phosphate buffer (pH 7.4), except Lsa21 e Lp95 C-terminus region that were in 100 mM Tris (pH 12.0) 500 mM NaCl, performed at 20°C. Far-UV CD spectra are represented as an average of five scans recorded from 185 to 260 nm. Ellipticity, (ϕ) is expressed in function of wavelength. **(B)** Percentage of secondary structure of the recombinant proteins according to the analysis of CD spectra data by the CAPITO software. ND: not determined.

Figure 3. Analysis of IgG production induced in mice by recombinant proteins. The sera from mice immunized with fused-proteins were analyzed by ELISA **(A)** and Western blotting **(B)**. In **(A)** wells were coated with DnaK or surface proteins, as depicted; in **(B)** blotted proteins are: DnaK (lane 1), Lsa21 (lane 2), rLIC10494 (lane

3), Lp95 C-terminus region (lane 4), rLIC12730 (lane 5). M, molecular mass protein marker. In both methods, proteins were probed with the respective anti-fusion protein serum (1:20,000 dilution) and the reactions were developed with HRP-conjugated anti-goat IgG (1:10,000) (ELISA) and HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:5,000) (Western).

Figure 4. Analysis of IgG isotype profile in serum of mice immunized with the recombinant proteins. Sera from BALB/c mice immunized with the recombinant proteins alone or in fusion with DnaK were analyzed by ELISA. IgG, IgG1 and IgG2a titers were evaluated in each case. Sera from PBS injected mice were employed as negative control. Statistical analyses were performed by two tailed *t*-test, comparing the titer obtained with leptospiral surface protein alone with the corresponding DnaK fusion protein.

Figure 5. Analysis of lymphocyte proliferation in cultured splenocytes from mice immunized with recombinant proteins. Splenocytes from immunized mice were isolated and cultured for 48 h. The cells were stimulated with the recombinant protein alone or in fusion with DnaK. Cells were further incubated with BrdU and DNA synthesis was quantified by BrdU immunodetection kit (M&M). ConA and culture medium were employed as positive and negative stimulation controls, respectively (not shown). The data are from two independent experiments.

Figure 6. Analysis of cytokine profiles from spleen cells supernatant. Spleen cells from immunized mice were isolated and cultured in 24-well tissue culture plates. After 48 h, cell-free culture supernatants were collected, and the level of cytokines, IFN- γ and IL-10, was measured by ELISA. For statistical analysis, concentration values for the recombinant fusion proteins-immunized group stimulated with the same protein were compared with those immunized and stimulated with the corresponding protein alone by the two-tailed *t*-test.

Table 1. Gene locus, protein given name, NCBI reference sequence number, features, sequence of the primers employed for DNA amplification, and molecular mass of expressed recombinant proteins.

Gene locus ¹	Recombinant protein given name	NCBI reference sequence number ²	Description/ function	Sequence of primers for PCR amplification and restriction cloning sites	Recombinant protein molecular mass
LIC10524	DnaK	YP_000508	molecular chaperone DnaK	F: 5' <u>GGATCC</u> GCTATGGAAGGTGGAGACCCGGTC 3' (BamHI) R: 5' <u>CCATGG</u> <u>GATATC</u> TCACAGCTG CGGACCCGGACCCTTTTCTCATCGTCTAC 3' (NcoI, EcoRV and PvuII)	68.9
LIC10368	Lsa21 ^a	YP_000355	Putative lipoprotein	F: 5' <u>GGATCC</u> <u>CAGCTG</u> GCTATGG CCTGTCCGGATGAAAAAAG 3' (BamHI and PvuII) R: 5' <u>CCATGG</u> <u>GATATC</u> TCAAAATACATTACACGAATATCTC 3' (NcoI and EcoRV)	19.8 kDa
LIC10494	rLIC10494 ^b	YP_000478	Putative lipoprotein	F: 5' <u>GGATCC</u> <u>CAGCTG</u> GCTATGG TAATCTTTGGCAACAAAAC 3' (BamHI and PvuII) R: 5' <u>CCATGG</u> <u>GATATC</u> TCA TTTGTTTTTCAGATTTTTTC 3' (NcoI and EcoRV)	25.1 kDa
LIC12690	Lp95 c-terminal ^c	YP_002611	Putative lipoprotein with a domain of unknown function (DUF1554)	F: 5' <u>GGATCC</u> <u>CAGCTG</u> GCTATGG AAAATGGAGAAGACGTTAC 3' (BamHI and PvuII) R: 5' <u>CCATGG</u> <u>GATATC</u> TCA TTGTTCCACACAAAGAATG 3' (NcoI and EcoRV)	43.6 kDa
LIC12730	rLIC12730 ^d	YP_002650	Hypothetical protein with TPR motif	F: 5' <u>GGATCC</u> <u>CAGCTG</u> GCTATGG GACTTCCCAATTTCTCTATTC 3' (BamHI and PvuII) R: 5' <u>CCATGG</u> <u>GATATC</u> TCA TTTCGTAAAAAATCCAGCTTC 3' (NcoI and EcoRV)	75.7 kDa

¹<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/> (Nascimento et al, 2004).

²<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>.

³Protein BLAST - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> (Altschul et al, 1997, 1990).

^aAtzingen et al, 2008, Atzingen et al, 2012.

^bAtzingen et al, 2010, Vieira et al, 2010.

^cAtzingen et al, 2009.

^dAtzingen et al, 2010, Vieira et al, 2010, Felix et al, 201

Figure 1

A

B

Figure 2

A

B

	α helix	β strand	irregular
Dnak	0.44	0.01	0.50
rLsa21	ND	ND	ND
Dnak-Lsa21	0.99	0.01	0.60
rLIC10494	0.25	0.13	0.62
Dnak-rLIC10494	0.99	0.01	0.60
rLp95	ND	ND	ND
Dnak -Lp95	0.99	0.01	0.01
rLIC12730	0.10	0.42	0.46
Dnak-rLIC12730	0.99	0.01	0.39

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6