MARIA FERNANDA CAVENAGUE PEREIRA

Interação de uma proteína de *Leptospira interrogans* a componentes do plasma e matriz extracelular do hospedeiro.

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

São Paulo
2018

MARIA FERNANDA CAVENAGUE PEREIRA

Interação de uma proteína de *Leptospira interrogans* a componentes do plasma e matriz extracelular do hospedeiro.

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento

Versão original

São Paulo
2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cavenague Pereira, Maria Fernanda
Interação de uma proteína de Leptospira
interrogans a componentes do plasma e matriz
extracelular do hospedeiro. / Maria Fernanda
Cavenague Pereira; orientadora Ana Lucia Tabet
Oller do Nascimento . -- São Paulo, 2018.
102 p.

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

1. Leptospira. 2. Leptospirose. 3. Proteína
recombinante. 4. Patogenicidade. 5. Sistema
complemento. I. , Ana Lucia Tabet Oller do
Nascimento, orientador. II. Título.

Presidente: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

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

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **807/2016** referente ao projeto intitulado: ***"Interação de duas proteínas de Leptospira interrogans a componentes do plasma e matriz extracelular do hospedeiro"*** sob a responsabilidade de ***Maria Fernanda Cavenague Pereira*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento***, do Departamento de Biotecnologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 14 de abril de 2016.

Prof. Dr. **Paulo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Interação de duas proteínas de *Leptospira interrogans* a componentes do plasma e matriz extracelular do hospedeiro.", protocolado sob o CEUA nº 4330120116, sob a responsabilidade de **Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento e equipe; Maria Fernanda Cavenague Pereira; Aline Florencio Teixeira; Luis Guilherme Fernandes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 18/05/2016.

We certify that the proposal "Interaction of two *Leptospira interrogans* proteins to plasma and extracellular matrix components of the host.", utilizing 20 Isogenics mice (20 females), protocol number CEUA 4330120116, under the responsibility of **Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento and team; Maria Fernanda Cavenague Pereira; Aline Florencio Teixeira; Luis Guilherme Fernandes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 05/18/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

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

Área: **Biociências**

Procedência: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **30 a 45 dias**

N: **20**

Linhagem: **Balb/c**

Peso: **18 a 22 g**

Resumo: A leptospirose é uma zoonose amplamente distribuída de interesse humano e veterinário. Em áreas urbanas, os roedores desempenham o papel de principais reservatórios da doença por permitirem a colonização das leptospiros nos túbulos renais proximais e as excretarem vivas na urina. Não há vacina eficaz até o momento. A identificação de proteínas da membrana externa conservadas que podem interagir com o hospedeiro são os principais alvos de pesquisa para elucidar os mecanismos de patogenicidade. São estas proteínas que, provavelmente, podem servir de alvo para o sistema imune do hospedeiro. Deste modo, diversos estudos têm buscado caracterizar e identificar as proteínas de superfície que sejam antigênicas e presentes nos diversos sorovares de *Leptospira interrogans*. Nesse sentido, o presente projeto propõe clonar e expressar duas lipoproteínas preditas de *Leptospira* codificadas pelos genes LIC13259 e LIC10562. As proteínas recombinantes serão purificadas por cromatografia de afinidade a metal e inoculadas em camundongos para avaliação da sua atividade imunogênica e obtenção de soros imunes. Estes soros serão utilizados como sonda para avaliar a presença de proteínas no extrato total de *Leptospira* spp. de diferentes sorovares, a fim de estudarmos sua conservação e localização celular. As proteínas presentes em diferentes leptospiros patogênicos serão avaliadas quanto à reatividade com anticorpos em soros de pacientes diagnosticados com a doença e sua capacidade de interagir com componentes da matriz extracelular e do plasma humano, para avaliação das mesmas no processo de adesão ao hospedeiro.

Local do experimento: Infectaria do Centro de Biociências

São Paulo, 18 de maio de 2016

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

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

Aos meus amados pais,
Giovana e Geraldo

Ao meu querido irmão, João Pedro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas graças recebidas, por toda força que sempre me deu e por todas as pessoas que colocou em meu caminho, permitindo meu crescimento pessoal e profissional.

À minha orientadora Dra Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento, pela oportunidade dada em seu laboratório, por todos os ensinamentos e conhecimento compartilhados e pelo incentivo para a realização do meu trabalho.

À minha coorientadora Dra Aline Teixeira, pela enorme paciência, por todos os ensinamentos e conhecimentos a mim repassados, pela dedicação, pelo apoio e companhia em todos os momentos.

Agradeço aos meus pais Giovana e Geraldo e meu querido irmão João Pedro, que apesar da distância sempre me apoiaram em todos os momentos, me incentivando e me dando forças. Que nunca deixaram me faltar amor e carinho, meu muito obrigado por estarem sempre presentes na minha vida.

Aos meus avós maternos, Vera e José João, por todo amor incondicional, paciência, carinho, dedicação e apoio.

À minha avó paterna Dulce (em memória), que não esteve fisicamente presente, mas com certeza sempre esteve me guiando e me iluminando nessa trajetória. Ao meu avô paterno por todo carinho.

Às minhas madrinhas Michele e Melissa, ao meu padrinho Neto e meus primos e primas pelo companheirismo e incentivo.

Ao meu namorado Lucas, por todo amor, incentivo, paciência e compreensão durante o desenvolvimento desse trabalho.

À todos os meus amigos que sempre estiveram presentes nessa jornada, Carolina, Fábio e Fernanda. Obrigada por todo apoio emocional!

À todos os meus amigos do laboratório, Dr Luis Guilherme, Dra Monica Vieira, Dr Jademilson, Brenda, Amanda, Maria Beatriz, Bruna, Felipe, Leandro e Fernanda por todas as discussões científicas e todos os momentos de descontração, proporcionando um ambiente de trabalho alegre e prazeroso.

À todos aqueles que já passaram pelo laboratório, Priscila, Jupciana, Gabriela, Lucas, Raquel, Roberta, Renan e Marcelo.

À equipe do prof. Marcos B. Heinemann, do Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da USP. Em especial agradeço a Gisele Souza e Antonio Filho pela colaboração na manutenção das culturas de leptospiros.

À Dra Eliete Romero do Instituto Adolfo Lutz pela doação dos soros de pacientes acometidos com leptospirose.

Ao Alexsander S. Souza do Departamento de Parasitologia do Instituto Butantan, pelo auxílio no uso do microscópio confocal.

Ao Dr Enéas de Carvalho pela paciência e dedicação nos ensaios de dicroísmo circular.

Aos professores das disciplinas que tive o prazer de participar, que contribuíram imensamente para a minha formação profissional.

Agradeço às secretárias da Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia. Fábiana, Eliane e Vânia.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2016/04295-3, pela bolsa de mestrado, bem como o auxílio a pesquisa, juntamente com o CNPq e Fundação Butantan.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para meu crescimento pessoal e profissional.

Meu muito obrigado a todos!

O sucesso é uma jornada, não um destino!

Tenha fé na sua capacidade.

Autor desconhecido

RESUMO

PEREIRA, M.F.C. **Interação de uma proteína de *Leptospira interrogans* a componentes do plasma e matriz extracelular do hospedeiro.** 2018, 103f. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia – Instituto Butantan, São Paulo, 2018.

A leptospirose é uma zoonose amplamente disseminada, causada pelo gênero patogênico de *Leptospira*. Essa doença apresenta grande interesse humano e veterinário, devido aos danos econômicos gerados. Em áreas urbanas, os roedores desempenham o papel de principais reservatórios da doença, pois albergam as leptospiras nos túbulos renais proximais e as excretam vivas na urina. Os humanos podem ser infectados de forma direta ou indireta, através de solo ou água contaminados. Após infecção pode-se apresentar sintomas leves ou mais severos como icterícia e hemorragia. O diagnóstico clínico da leptospirose é dificultoso devido aos sintomas iniciais serem comuns à de outras doenças. As vacinas existentes são baseadas em bactérias inativadas, não conferem proteção duradoura, além de serem específicas para os sorovares presentes na preparação. Atualmente, já foram identificados mais de 250 sorovares diferentes da bactéria, sendo assim, a identificação de proteínas da membrana externa conservadas entre diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* e que podem interagir com o hospedeiro são os principais alvos de pesquisa para o desenvolvimento de vacinas. Estas proteínas podem induzir uma resposta imune no hospedeiro e são importantes para elucidar os mecanismos de patogenicidade. Deste modo, diversos estudos têm buscado caracterizar e identificar as proteínas de superfície que sejam antigênicas e presentes nos diversos sorovares de *Leptospira interrogans*. O primeiro passo deste trabalho foi avaliar por programas de bioinformática a localização celular, a presença de sinal de exportação e/ou lipidação, presença de domínios conservados e similaridade com outras sequências. Inicialmente, os genes LIC10562 e LIC13259 foram amplificados por PCR utilizando o DNA da *L. interrogans* sorovar Copenhageni e os fragmentos de DNA gerados foram clonados no vetor pGEM T-Easy e subclonados no vetor de expressão pAE e expressas em cepas de *Escherichia coli*. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade ao metal. A proteína recombinante codificada pelo gene LIC10562 apresentou dificuldades durante a purificação. Por esse motivo, os estudos com esse gene foram interrompidos. Por outro lado, a purificação da LIC13259 foi obtida com sucesso. Desse modo, a presença de estrutura secundária da rLIC13259 foi avaliada por dicroísmo circular e sua atividade imunogênica foi analisada após imunização em camundongos Balb/c.

Ensaio de localização celular demonstraram a exposição da proteína na superfície das bactérias, o que corrobora com as análises de bioinformática. Além disso, rLIC13259 foi reconhecida por soro de indivíduos infectados, sugerindo sua expressão durante a infecção. Ensaio de interação com componentes do hospedeiro mostraram que a proteína rLIC13259 foi capaz de se ligar a laminina, plasminogênio, vitronectina, C7, C8 e C9 de maneira dose-dependente. Além disso, rLIC13259 foi capaz de recrutar estes componentes direto do soro humano, revelando a importância desta interação. A ligação de rLIC13259 com PLG foi capaz de gerar plasmina, sugerindo que esta proteína pode contribuir nos processos de invasão da bactéria no hospedeiro. A interação da rLIC13259 com os componentes do sistema complemento parece ocorrer via os domínios de heparina. Além disso, o envolvimento da proteína recombinante com C9 foi capaz de inibir a polimerização de C9, consequentemente, inibindo a formação do complexo de ataque à membrana (MAC). Em conjunto, nossos dados sugerem a participação da proteína LIC13259 nos mecanismos de invasão e evasão do sistema imune do hospedeiro.

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

ABSTRACT

PEREIRA,M.F.C. **Interaction of a *Leptospira interrogans* protein with plasma components and extracellular matrix of the host.** 2018, 103 p. Master thesis (Biotechnology) - Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia – Instituto Butantan, São Paulo, 2018.

Leptospirosis is a widely disseminated zoonosis, caused by the pathogenic genus *Leptospira*. This disease presents great human and veterinary interest due to economic. In urban areas, rodents are the major reservoir of the disease. The leptospires colonize the proximal renal tubules and shedding them live in urine. Humans can be infected directly or indirectly through contaminated soil or water. After the infection, mild or more severe symptoms such as jaundice and bleeding may occur. The clinical diagnosis of leptospirosis is difficult because the initial symptoms are common in other diseases. Existing vaccines are based on inactivated bacteria, do not confer lasting protection, and are serovar specific. Currently, more than 250 different serovars of the bacterium have been identified, therefore, the identification of outer membrane proteins conserved between different species and serovars of *Leptospira* and that may interact with the host are the main research targets for the vaccine development. These proteins can serve as targets for the immune system of the host. Thus, several studies have sought to characterize and identify as surface proteins that are antigenic and present in the various serovars of *Leptospira interrogans*. The first step of this work was to evaluate the cellular localization, presence of export signal and / or lipidation, presence of conserved domains and similarity with other sequences through the bioinformatics programs. Initially, LIC10562 and LIC13259 genes were amplified by PCR using the *L. interrogans* serovar Copenhageni DNA. The generated DNA fragments were cloned into the pGEM T-Easy vector and subcloned into the pAE expression vector and expressed in strains of *Escherichia coli*. Recombinant proteins were purified by metal affinity chromatography. The recombinant protein encoded by the LIC10562 gene presented difficulties during purification. For this reason, study with this gene has been discontinued. On the other hand, the purification of LIC13259 was successfully achieved. The presence of secondary structure of rLIC13259 was assessed by circular dichroism and its immunogenic activity was analyzed after immunization in Balb / c mice. Cell localization assays have demonstrated the exposure of the protein to the surface of the bacteria, which corroborates with bioinformatics analyzes. In addition, rLIC13259 was recognized by sera from infected individuals, suggesting its expression during infection. Interaction with host components showed that the rLIC13259 protein was able to

bind laminin, plasminogen, vitronectin, C7, C8 and C9 in a dose-dependent manner. In addition, rLIC13259 was able to recruit these components directly from human serum, revealing the importance of this interaction. The binding of rLIC13259 to PLG was able to generate plasmin, suggesting that this protein may contribute to the invasion processes of the bacterium in the host. The interaction of rLIC13259 with components of the complement system appears to occur via the heparin domains. In addition, the involvement of the recombinant protein with C9 was able to inhibit the polymerization of C9, consequently, inhibiting a formation of the membrane attack complex. Taken together, our data suggest the participation of the LIC13259 protein in the mechanisms of invasion and evasion of the host immune system.

Palavras-chave: *Leptospira*. Leptospirosis. Recombinant protein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Microscopia eletrônica de varredura de <i>L. interrogans</i> sorovar <i>Icterohaemorrhagiae</i>	23
Figura 2- Arquitetura de membrana de <i>Leptospira</i>	24
Figura 3 - Ciclo de transmissão da leptospirose	26
Figura 4 - Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy	35
Figura 5- Mapa do vetor de expressão pAE	36
Figura 6- Cladogramas obtidos pelo software Clustal Omega por alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos disponíveis no GenBank	52
Figura 7- Análise da expressão das proteínas recombinantes em diferentes cepas de <i>E. coli</i> por meio de SDS-PAGE 15%	54
Figura 8 - Análise da expressão das proteínas recombinantes em diferentes cepas de <i>E. coli</i> por imunoblotting utilizando anticorpo anti-His	55
Figura 9- Análise da proteína após purificação da proteína recombinante LIC10562	57
Figura 10- Análise da proteína após purificação e quantificação da proteína recombinante LIC13259	58
Figura 11 - Avaliação dos estados oligoméricos da proteína recombinante LIC13259	59
Figura 12- Espectro gerado pela análise de dicroísmo circular	60
Figura 13- Produção de anticorpos IgG após imunização de camundongos com a proteína recombinante	62
Figura 14 - Reatividade da proteína rLIC13259 com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose por ELISA	63
Figura 15- Reatividade da proteína rLIC13259 com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose	64
Figura 16 - Detecção da proteína nativa em extratos de <i>Leptospira</i> spp	65
Figura 17- Detecção da proteína nativa em extratos de <i>Leptospira</i> spp	66
Figura 18 - Localização da proteína nativa LIC13259 nas leptospiros	67
Figura 19 - Ensaio de Imunofluorescência	68
Figura 20 - Western Blotting para avaliação de acessibilidade da PK	70
Figura 21- Ensaio de adesão da proteína recombinante a componentes da matriz extracelular	72
Figura 22 - Efeito do metaperiodato de sódio na interação da proteína recombinante a laminina	73
Figura 23 - Efeito da desnaturação termina da proteína recombinante na interação à laminina	74
Figura 24 - Análise da interação da proteína recombinante a componentes do plasma	76
Figura 25 - Efeito da proteína desnaturada na ligação ao plasminogênio	77
Figura 26 - Influência dos resíduos de lisina na ligação da proteína recombinante ao plasminogênio	78
Figura 27 - Análise da ativação do plasminogênio em plasmina	79
Figura 28 - Avaliação do recrutamento do plasminogênio a partir do soro humano	80
Figura 29 - Análise da interação da proteína recombinante a componentes do sistema complemento	82
Figura 30 - Curva de dose-resposta da interação da proteína recombinante aos componentes	83
Figura 31 - Efeito da proteína desnaturada na ligação aos componentes do sistema complemento	84

Figura 32 - Influência dos domínios de heparina na ligação da proteína recombinante aos componentes do sistema complemento..	85
Figura 33 - Recrutamento de C7, C8, C9 e vitronectina a partir do soro humano.	86
Figura 34- Ensaio de polimerização de C9	87
Figura 35- Eletroferograma das sequências de DNA	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes por PCR.	34
Tabela 2 - Resumo das análises por bioinformática..	51
Tabela 3 - Massa molecular e PI teórico das proteínas recombinantes..	56
Tabela 4 - Estrutura secundária predita com base em diferentes programas e detectada por dicroísmo circular.	61

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs - Absorbância

ACA – Ácido aminocapróico

Amp - ampicilina

BSA – albumina soro bovino

C4BP – proteína ligante de C4

CD – dicroísmo circular

Da - dalton

dNTP - desoxirribonucleotídeo

DNA – ácido desoxirribonucléico

DO – densidade óptica

ECM – matriz extracelular

EDTA – ácido etilenodiamino

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática

EMJH – Ellinghausen-McCullogh/ Johnson-Harris

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FH – fator H

His – histidina

Ig - imunoglobulina

IP – iodeto de propídeo

IPTG – isopropil- β -tiogalactopiranosídeo

LB – meio Luria-Bertani

Len – *Leptospiral endostatin-like*

LIC – *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

Lig – *Leptospiral immunoglobulin-like*

LPS - lipopolissacarídeo

Lsa – *Leptospiral surface adhesin*

MAC – complexo de ataque à membrana

MAT – Teste de microaglutinação

OMP – proteína de membrana externa

OPD – cloridrato de o-fenilenodiamina

Pb – pares de base

PBS – fosfato salina

PBS/s – PBS baixo sal

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

PBS-T/Leite - fosfato salina contendo 0,05% Tween 20 e 10% de leite desnatado

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogênico

pI – ponto isoelétrico

PK – proteinase K

PLG – plasminogênio

PMSF – fenilmetilsufonil flúor

Rpm – rotação por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

TAE – tris-acetato EDTA

TLR – receptor do tipo toll

T_m – temperatura de fusão (*melting*)

tPA – ativador de plasminogênio do tipo tecidual

uPA – ativador de plasminogênio do tipo uroquinase

X-gal – 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	<i>Leptospira</i> spp.....	23
1.2	Leptospirose.....	25
1.3	Vacinas contra leptospirose.....	27
1.4	Mecanismos de patogenicidade	28
2.	OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	Cepas de <i>Leptospira</i> spp.....	32
3.2	Extração de DNA genômico das Leptospiras spp.....	32
3.3	Análises por bioinformática (<i>in silico</i>) dos genes selecionados.....	33
3.4	Desenho dos primers	33
3.5	Amplificação por PCR.....	34
3.6	Clonagem no vetor pGEM-T Easy	34
3.7	Clonagem no vetor de expressão pAE	36
3.8	Sequenciamento das construções pAE/inserto.....	37
3.9	Expressão das proteínas recombinantes.....	37
3.10	Purificação e diálise das proteínas recombinantes.....	38
3.11	Dicroísmo circular (CD)	39
3.12	Estrutura tridimensional da proteína.....	40
3.13	Imunização de camundongos para obtenção de anticorpo policlonal	40
3.14	Preparação do extrato de <i>E. coli</i>	40
3.15	Titulação de anticorpos.....	41
3.16	Detecção de anticorpos IgG em soros de paciente diagnosticados com leptospirose em fase inicial e fase convalescente da doença	41
3.17	Preparo dos extratos proteicos de <i>Leptospira</i> spp.	42
3.18	Separação das proteínas por <i>Imunoblotting</i>	42
3.19	Ensaio de localização da proteína nativa nas leptospiras intactas.....	43
3.20	Ensaio de Imunofluorescência.....	43
3.21	Ensaio de acessibilidade por proteinase K (PK).....	44
3.22	Componentes biológicos.....	45
3.23	Interação da proteína recombinante a componentes da matriz extracelular, plasma e do sistema complemento	45

3.24	Curva de dose-resposta da ligação das proteínas recombinantes aos componentes	46
3.25	Ensaio de inibição da ligação pela desnaturação térmica da proteína recombinante	46
3.26	Caracterização da ligação da proteína recombinante à laminina.....	47
3.27	Caracterização da ligação da proteína recombinante ao plasminogênio	47
3.28	Ensaio de atividade enzimática da plasmina	47
3.29	Caracterização da ligação da proteína recombinante aos componentes do sistema complemento.....	48
3.30	Recrutamento de plasminogênio e componentes do sistema complemento a partir do soro humano	48
3.31	Ensaio de polimerização de C9	49
3.32	Comitê de Ética animal e humano.....	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	Análise de bioinformática dos genes selecionados.....	49
4.2	Análise da presença dos genes entre as diversas espécies e sorovares de <i>Leptospira</i>	51
4.3	Clonagem e expressão dos genes selecionados	53
4.4	Expressão das proteínas recombinantes.....	53
4.5	Purificação e diálise das proteínas recombinantes.....	56
4.6	Avaliação dos estados oligoméricos da proteína recombinante	58
4.7	Avaliação da estrutura secundária por dicroísmo circular.....	59
4.8	Avaliação da atividade imunológica da proteína recombinante LIC13259 em camundongos BALB/c	61
4.9	Reatividade da proteína recombinante com soro de pacientes	62
4.10	Presença da proteína nativa em diferentes espécies de <i>Leptospira</i> spp.	64
4.11	Ensaio de localização da proteína nativa nas leptospiros intactas.....	66
4.12	Análise da localização celular da proteína nativa por imunofluorescência	67
4.13	Ensaio de acessibilidade por Proteinase K (PK).....	68
4.14	Avaliação e caracterização da interação da proteína recombinante com componentes do hospedeiro.....	70
4.15	Adesão da proteína recombinante a componentes da matriz extracelular	71
4.16	Caracterização da ligação da proteína recombinante à laminina.....	72
4.17	Efeito da proteína desnaturada na ligação à laminina.....	73
4.18	Interação da proteína recombinante a componentes do plasma humano.....	74
4.19	Efeito da proteína desnaturada na ligação ao plasminogênio	76
4.20	Efeito do ACA na interação da proteína ao PLG.....	77

4.21	Conversão do plasminogênio à plasmina na presença da proteína recombinante	78
4.22	Recrutamento do plasminogênio a partir do soro humano	79
4.23	Interação da proteína recombinante a componentes do sistema complemento...	80
4.24	Efeito da proteína desnaturada na ligação aos componentes do sistema complemento	83
4.25	Caracterização da interação da proteína recombinante aos componentes do sistema complemento	84
4.26	Recrutamento de C7, C8, C9 e vitronectina a partir do soro humano.....	85
4.27	Ensaio de polimerização de C9	86
5.	CONCLUSÃO	88
Anexo 1		100
Anexo 2		101

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Leptospira spp.*

As leptospiros são bactérias que pertencem à família *Leptospiraceae* e à ordem *Spirochaetales*. De modo geral, as espiroquetas são bactérias finas, enroladas de forma helicoidal e apresentam motilidade devido a presença de dois endoflagelos. As leptospiros se diferenciam de outras espiroquetas por apresentarem uma característica morfológica única em suas extremidades, que são semelhantes a um ponto de interrogação (Figura 1) (Faine *et al.*, 1999).

Figura 1- Microscopia eletrônica de varredura de *L. interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae*
Fonte: (Levett, 2001)

As leptospiros apresentam uma arquitetura de membrana peculiar, uma vez que se assemelham tanto a bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas (Figura 2). A presença de membrana citoplasmática, membrana externa e lipopolissacarídeo (LPS) são características de bactérias Gram-negativas; por outro lado, a associação íntima da membrana citoplasmática com o peptidoglicano é uma característica peculiar das bactérias Gram-positivas (Haake e Matsunaga, 2010).

Figura 2- Arquitetura de membrana de *Leptospira*. OM- membrana externa, PS- espaço periplasmático, IM- membrana interna, F- flagelo, PG- peptidoglicano.
Fonte: (Fernandes *et al.*, 2015)

Em leptospiros, o LPS é o principal componente de superfície; é composto por lipídeo A, uma parte central (*core*) e polissacarídeo ou antígeno O (Faine *et al.*, 1999). Embora a estrutura do LPS de leptospira seja similar aos de outras bactérias, sua toxicidade é menor quando comparada ao LPS de *E. coli*. Provavelmente, essa toxicidade reduzida é devido às características únicas encontradas na região do lipídeo A (Haake e Zückert, 2015). Diferenças nessas regiões são responsáveis pelo reconhecimento diferencial, mediado por receptores Toll-like 4, visto que o LPS de leptospira é incapaz de interagir com este receptor humano. (Werts *et al.*, 2001; Nahori *et al.*, 2005; Chassin *et al.*, 2009).

O LPS de leptospiros apresenta outras funções importantes. Primeiramente, é a base de proteção das vacinas inativadas (bacterina) e segundo, é a base da classificação sorológica dessas bactérias (Adler e De La Peña Moctezuma, 2010). Mais de 250 sorovares de leptospiros já foram identificados pelo teste de microaglutinação (MAT), o qual avalia a capacidade de anticorpos se aglutinarem após o reconhecimento de epítopos antigênicos presentes na porção variável do LPS (Haake e Zückert, 2015). A classificação sorológica das leptospiros tem grande relevância epidemiológica, e mesmo após as leptospiros terem sido classificadas geneticamente, a sorologia continua sendo a classificação mais utilizada para diferenciação das leptospiros (Plank e Dean, 2000).

Além da classificação sorológica, as leptospirosas são classificadas geneticamente, por hibridização de DNA. Nesta classificação, são conhecidas 22 espécies, sendo 9 patogênicas (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchi*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, *L. alstoni*, *L. kmetyi*), 7 saprofíticas de vida livre (*L. biflexa*, *L. yanagawae*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. idonii*) e 5 intermediárias (*L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolfii* e *L. licherasiae*), cuja patogenicidade ainda é indeterminada (Cerqueira e Picardeau, 2009; Fouts *et al.*, 2016).

Apesar do grupo das patogênicas ser formado por 9 espécies diferentes, metade dos sorovares patogênicos são classificados em *L. interrogans* ou *L. borgpetersenii* (Ahmed *et al.*, 2006), sendo que, os sorovares Pomona, Icterohaemorrhagiae, Bataviae, Autumnalis e Copenhageni de *L. interrogans* são mais associados à infecção de porcos, gados e roedores e humanos (Faine *et al.*, 1999). No Brasil, *L. interrogans* sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni são as principais causas da leptospirose urbana, e por isso, tem sido amplamente estudados. Enquanto isso, na leptospirose rural os sorovares associados têm sido negligenciados (Mcbride *et al.*, 2005).

1.2 Leptospirose

Leptospirose é uma zoonose mundial causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, que afeta principalmente países em desenvolvimento (Levett, 2001). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a leptospirose é considerada uma doença tropical negligenciada, onde há uma estimativa de 500 milhões de pessoas infectadas por ano, o que resulta em cerca de 60 mil mortes. A doença é prevalentemente delimitada às regiões Sul e Sudeste da Ásia, Oceania, Caribe, África e regiões Andina, Central e Tropical da América Latina (Costa *et al.*, 2015).

No Brasil, são relatados cerca de 3 a 4 mil casos de leptospirose por ano, sendo que a maioria ocorre nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Paraná, Pernambuco e Espírito Santo (SVS/MS/Brasil, 2006-2011). O número de casos elevado nessas regiões é devido às condições higiênico-sanitárias precárias associadas com alto índice de enchentes e alagamentos causados durante os períodos de chuva. Esta condição é propícia para os roedores, principais reservatórios da doença, sobretudo, a espécie *Rattus norvegicus* (rato de esgoto) e *Rattus rattus* (rato de telhado), pois são os principais portadores de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Bharti *et al.*, 2003). Além disso, a leptospirose é considerada uma doença ocupacional, pois atinge trabalhadores de serviços de

água e esgotos, canaviais, arrozais, bebedouros, tratadores de animais, veterinários, entre outros (Sakata *et al.*, 1992).

O homem é o hospedeiro acidental da leptospira e pode se infectar por exposição direta ou indireta à urina de animais infectados. As leptospirosas penetram no indivíduo via mucosas, por meio de pequenos ferimentos encontrados na pele ou por meio da pele íntegra, mas com poros dilatados, quando há contato prolongado com o ambiente úmido contaminado. Após a penetração, essas bactérias são capazes de disseminar-se pelo sistema linfático ou pela corrente sanguínea para múltiplos órgãos (Figura 3). A evolução da doença está relacionada com o estado imunológico e idade do hospedeiro, com o tipo de cepa e a dose infectante da bactéria (Faine *et al.*, 1999; Cinco, 2010). De qualquer forma, a leptospirose representa um problema econômico para o Sistema de Saúde Pública, pois o tratamento requer uso de antibióticos, hospitalização e em alguns casos diálise renal (Maciel *et al.*, 2008).

Figura 3 - Ciclo de transmissão da leptospirose

Fonte: (Ko *et al.*, 2009).

A leptospirose possui um quadro de manifestação clínica muito variada. Os sintomas iniciais são comuns a outras doenças tropicais, como febre, calafrios, cefaléia, dores musculares, enjoo, vômitos e diarreia. Em torno de 5 - 10% dos casos da doença evoluem para formas severas da doença, conhecido como síndrome de Weil e a síndrome hemorrágica

pulmonar. As formas severas da leptospirose são caracterizadas por hemorragia, falência renal e hepática e possuem elevada taxa de mortalidade (Levett, 2001). Uma vez que os sintomas iniciais, muitas vezes, são confundidos com os de outras doenças, a leptospirose é subdiagnosticada, gerando um baixo índice de casos notificados (Faine *et al.*, 1999; Marotto *et al.*, 1999; Gouveia *et al.*, 2008).

O fato dos sintomas serem confundidos com outras doenças também dificulta o diagnóstico clínico. Atualmente, as técnicas utilizadas para o diagnóstico da doença incluem a detecção de anticorpos pelo uso de testes de microaglutinação (MAT) e ensaio imunoenzimático. Além disso, leptospirosas podem ser detectadas após o cultivo de urina ou tecidos infectados, ou por meio da técnica de PCR (Levett, 2001).

O método MAT é considerado como o teste padrão para diagnóstico da leptospirose. Assim, soros de indivíduos supostamente contaminados são incubados com um painel de bactérias, onde a maior diluição do soro capaz de aglutinar 50% das bactérias é considerada como título, sendo que o título determinado para considerar a reação positiva é variável de acordo com cada região. Neste teste, é recomendada a análise de amostras pareadas de soro, visto que no início da doença os indivíduos ainda não apresentam anticorpos circulantes. Assim, soros de indivíduos analisados inicialmente podem gerar resultados negativos (MAT -), porém quando analisados novamente, resultados positivos podem ser encontrados (MAT +). Apesar de o teste MAT ser sensível e específico, resultados positivos só são gerados após o início da fase imune, que ocorre por volta de 10 dias após o contato inicial com as leptospirosas (Levett, 2001; Guerra, 2013).

O tratamento da leptospirose é a base de antimicrobianos e terapia de suporte. As leptospirosas são sensíveis a vários antibióticos, sendo que o tratamento deve ser iniciado logo na primeira semana de infecção, evitando a evolução para os quadros severos da doença. Nestes casos da doença, o tratamento com antibióticos é realizado por via intravenosa. Embora o tratamento com antibióticos seja efetivo, vacinas profiláticas ou imunoterapêuticas são estratégias interessantes para o controle da doença (Yang *et al.*, 2006).

1.3 Vacinas contra leptospirose

Embora vacinas sejam interessantes para o controle da doença, no Brasil não existe vacinas para humanos. Atualmente existem vacinas licenciadas para o uso humano em alguns países como China, Rússia, França, Cuba e Japão (Ikoev *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2003;

Martínez *et al.*, 2004). No entanto, essas vacinas são constituídas basicamente de bactérias inativadas ou preparações de membrana de leptospiros patogênicos, e induzem uma resposta protetora a partir da produção de anticorpos contra lipopolissacarídeos presente nas bactérias (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001). Por esse motivo, falham em induzir proteção em longo prazo contra infecção, o que requer administração anual ou semestral (Bolin *et al.*, 1989); além disso, não promovem proteção cruzada contra sorovares de leptospiros não incluídas na preparação da vacina.

O avanço tecnológico permitiu o desenvolvimento de uma nova estratégia, a vacinologia reversa (VR), que utiliza a bioinformática para detectar possíveis candidatos vacinais, permitindo a identificação de proteínas-alvo e determinando sua provável localização no microrganismo (Rappuoli, 2000). A técnica da vacinologia reversa surgiu em paralelo ao sequenciamento da *Neisseria meningitidis* sorogrupo B e tem se mostrado promissora, pois permitiu o desenvolvimento de uma vacina contra *Neisseria meningitidis* sorogrupo B (Pizza *et al.*, 2000). Neste sentido, o sequenciamento do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Nascimento *et al.*, 2004) contribuiu significativamente para o entendimento desta bactéria e impulsionaram a identificação de alvos vacinais pela vacinologia reversa.

O primeiro estudo utilizando proteínas recombinantes de leptospiros 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 *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 (Haake *et al.*, 1999; Gamberini *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2009; Atzingen *et al.*, 2010; Atzingen *et al.*, 2012; Evangelista *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2017).

1.4 Mecanismos de patogenicidade

O sucesso durante uma infecção é dado pela capacidade que os microrganismos apresentam frente aos processos de adesão, invasão e evasão do sistema imune. Desse modo, quando em contato com o hospedeiro, os microrganismos devem ser capazes de aderir de forma eficiente à pele ou mucosa do hospedeiro, invadir as células, colonizar e se disseminar para múltiplos órgãos, e ainda, promover danos nesses órgãos e tecidos. Assim, a capacidade de um microrganismo causar doença está relacionada ao seu potencial em desenvolver

estratégias capazes de driblar o sistema imune do hospedeiro. Tais estratégias compreendem a ativação de genes relacionados à virulência, estresse, transporte de nutrientes, locomoção, entre outros (Ljungh *et al.*, 1996).

Os mecanismos de patogenicidade das leptospiros ainda não são totalmente elucidados, contudo, o sequenciamento de genomas e o grande avanço nas ferramentas de bioinformática contribuíram para identificação de novos genes envolvidos no processo de virulência das leptospiros. Inicialmente, o sequenciamento da *L. interrogans* sorovar Copenhageni junto com a análise *in silico* das sequências codificadoras identificou 174 novas lipoproteínas, a maioria ainda não identificada em nenhum outro organismo (Nascimento *et al.*, 2004). Desse modo, foi descoberto que as leptospiros apresentam diversas proteínas em sua superfície responsáveis por mediar adesão às células do hospedeiro, aos componentes da matriz extracelular (ECM), a interação com componentes do plasma humano e componentes do sistema complemento do hospedeiro (Fernandes *et al.*, 2015).

Estudos demonstram que as leptospiros conseguem se aderir às células endoteliais, células epiteliais renais, fibroblastos e macrófagos cultivados *in vitro* (Thomas e Higbie, 1990; Liu *et al.*, 2007). Ainda nesse sentido, as bactérias são capazes de se ligarem aos componentes da MEC, tais como, laminina, colágenos I e IV, fibronectina plasmática e celular, elastina e proteoglicanos (Vieira *et al.*, 2014). A primeira adesina de leptospiros descrita foi uma proteína de 36 kDa que se mostrou capaz de interagir com fibronectina (Merien *et al.*, 2000). Um pouco mais tarde, nosso grupo identificou a primeira proteína com capacidade de ligação a laminina e foi nomeada como Lsa24 (Barbosa *et al.*, 2006). A partir disso, a capacidade de interação com a MEC foi demonstrada para diversas proteínas, tais como as proteínas LigA e LigB e a lipoproteína LipL32 (Vieira *et al.*, 2014).

Ao alcançar a corrente sanguínea as leptospiros precisam superar o sistema imunológico do hospedeiro e se disseminarem para atingir outros tecidos. Estudos anteriores demonstraram que as leptospiros patogênicas são capazes de resistir à ação antibactericida do soro humano, enquanto que as saprofíticas são eliminadas rapidamente, no entanto, a atividade antibactericida é destruída quando o soro humano é aquecido a 56 °C por 30 minutos, demonstrando que a atividade bactericida do soro é devido às proteínas do sistema complemento. (Johnson e Muschel, 1965; Johnson e Muschel, 1966; Meri *et al.*, 2005). O sistema complemento é considerado uma das primeiras linhas de defesa contra a invasão de microrganismos devido a suas atividades de opsonização, inflamação e lise. A ativação do sistema complemento ocorre por três vias diferentes: clássica, alternativa e lítica. Todas as três vias convergem para a formação de um complexo terminal citolítico (Abbas *et al.*, 2015).

As leptospiros são capazes de controlar todas as vias do sistema complemento através da interação com reguladores solúveis do hospedeiro fator H (FH) e C4 *binding protein* (C4BP). Esses reguladores ligados à bactéria mantêm sua atividade de cofator para a enzima fator I, responsável pela clivagem de C3b e C4b. Desse modo, 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; Fraga *et al.*, 2016). Além disso, as leptospiros conseguem adquirir vitronectina, uma reguladora da via terminal do complemento que atua inibindo a formação do complexo C5b7 e a polimerização de C9 na superfície do patógeno. Dessa maneira, a aquisição da vitronectina na leptospira pode protegê-la contra a lise, e conseqüentemente, auxiliar na evasão do sistema imune do hospedeiro (Fraga *et al.*, 2016).

Poucas proteínas envolvidas no processo de evasão do sistema complemento foram descritas até o momento. A primeira proteína capaz de se ligar ao fator H e fator H *related protein* (FHR-1) purificados foi LfhA/Lsa24/LenA (Barbosa *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2006; Stevenson *et al.*, 2007). Outras proteínas que são capazes de se ligar ao fator H são as proteínas LigA e LigB, o fator de elongação Tu, Lsa23 e LcpA (Castiblanco-Valencia *et al.*, 2012; Wolff *et al.*, 2013; Da Silva *et al.*, 2015; Siqueira, Atzingen, *et al.*, 2016a). As proteínas Ligs também são capazes de se ligarem ao C4BP, assim como a proteína LcpA (Barbosa *et al.*, 2010; Castiblanco-Valencia *et al.*, 2012). Quatro proteínas foram descritas pelo nosso grupo de pesquisa como ligante de C4BP, são elas Lsa30, Lsa23, Lsa25 e Lsa33 (Domingos *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2012; Siqueira *et al.*, 2013).

As leptospiros também utilizam enzimas proteolíticas para evadir o sistema imunológico do hospedeiro. A degradação das proteínas do sistema complemento pode ocorrer indiretamente, utilizando as proteases adquiridas do próprio hospedeiro, como o plasminogênio (PLG) (Vieira *et al.*, 2011), ou diretamente pelas proteases endógenas produzidas pelas cepas patogênicas de *Leptospira* (Fraga *et al.*, 2016). Nosso grupo mostrou pela primeira vez que as leptospiros são capazes de se ligar ao PLG humano, principal componente do sistema fibrinolítico. Dessa maneira, o PLG ligado à superfície da bactéria, na presença do ativador, é convertido em plasmina, enzimaticamente ativa. A plasmina é capaz de degradar diversos substratos biológicos, incluindo imunoglobulinas, C3b, C5, bem como fibrinogênio e fibronectina, contribuindo para as habilidades da leptospira de invadir e evadir o sistema imune (Vieira *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2011). O sistema proteolítico tem se demonstrado bastante importante para os estágios iniciais da infecção da leptospira, uma vez 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).

Diversas proteínas de membrana têm sido caracterizadas como receptores de PLG, indicando que a interação das leptospiros com esse sistema proteolítico é de grande importância para a patogênese da leptospirose. Algumas delas são LigA e LigB (Choy *et al.*, 2007), LenA (Verma *et al.*, 2010), Lsa46, Lsa77 (Teixeira *et al.*, 2015), Lsa23 (Siqueira *et al.*, 2013), Lsa16, Lsa25.6 (Pereira *et al.*, 2017), Lsa19, Lsa14 (Figueredo *et al.*, 2017), Lsa37 (Silva *et al.*, 2016), LipL46 (Santos *et al.*, 2018).

A secreção de proteases foi descrita recentemente como mecanismo de evasão imune para leptospira. Foi demonstrado que a metaloprotease MMP9 juntamente plasmina contribui para a invasão e disseminação rápida das leptospiros (Vieira *et al.*, 2013). As metaloproteases da família de termolisinas parecem ser responsáveis por clivarem diretamente proteínas do complemento, tais como, C3, C2, C4b e fator B. Essa estratégia contribui para a inibição das três vias do sistema complemento, o que permite que a bactéria consiga evadir o sistema imunológico do hospedeiro e estabelecer a infecção (Fraga *et al.*, 2014).

Embora nos últimos anos diversas proteínas de leptospira tenham sido identificadas como possíveis fatores de virulência, os mecanismos de patogenicidade das leptospiros ainda não foram completamente elucidados, sendo assim, nossos estudos devem facilitar a identificação de proteínas importantes para o desenvolvimento de métodos diagnósticos e novas vacinas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar uma lipoproteína de superfície de *Leptospira* quanto à capacidade de interagir com componentes da matriz extracelular, do plasma humano e do sistema complemento humano.

2.2 Objetivos específicos

- Clonar o gene, expressar e purificar a proteína de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, empregando *Escherichia coli* como sistema hospedeiro de expressão;

- Caracterizar a proteína recombinante quanto a sua estrutura;
- Avaliar a reatividade da proteína com anticorpos presentes em soros de paciente acometidos com leptospirose;
- Avaliar a presença da proteína nativa em diferentes espécies e sorovares de leptospira;
- Caracterizar a interação da proteína recombinante com componentes da matriz extracelular, do plasma humano e do sistema complemento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas de *Leptospira* spp.

As leptospiras foram cultivadas a 28 °C sob condições aeróbias em meio EMJH líquido (Difco®, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) com 10% (v/v) de soro de coelho, enriquecido com L-asparagina (m/v: 0,001%), cloreto de magnésio (m/v: 0,001%), peptona (m/v: 0,03%) e extrato de carne (m/v: 0,001%). As subculturas são mantidas por cerca de 14 dias antes de serem subcultivadas. As cepas patogênicas atenuadas em cultura utilizadas foram: *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M20); *L. interrogans* sorovar Canicola (Hound Utrecht IV); *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae (RGD); *L. interrogans* sorovar Pomona (Pomona) *L. borgpetersenii* sorovar Whitticombi (Whitticombi); *L. kirschneri* sorovar Cynopteri (3522C); *L. kirschneri* Grippotyphosa (Moskva V); *L. santarosai* sorovar Shermani (1342K). A cepa virulenta utilizada foi *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Fiocruz L1-130) e a cepa saprofítica foi *L. biflexa* sorovar Patoc (Patoc 1). 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 foram cedidas pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo, Brasil.

3.2 Extração de DNA genômico das *Leptospiras* spp.

O material genético das cepas de leptospiras descritas acima foi extraído. As culturas bacterianas foram crescidas em meio EMJH por um período aproximado de sete dias (Johnson, Harris, 1967). Após o crescimento, 3 mL de cultura foram coletados e submetidos

ao processo de centrifugação por 2 minutos a 6000 rpm em temperatura ambiente. O pellet formado foi ressuspensão em 467 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0) 30 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 3 µL de 20 mg/mL de proteinase K (Sigma – Aldrich, St Louis, Mo, EUA). A mistura foi homogeneizada e incubada por 1 hora a 37 °C. Após incubação, um volume igual da solução fenol-clorofórmio 1:1 foi adicionado, e essa mistura foi agitada até que as fases fossem completamente misturadas. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi recuperado. Essa fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo e a extração por fenol-clorofórmio 1:1 foi repetida. Após a recuperação do sobrenadante, foi adicionado 1/10 volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 0,6 volumes de isopropanol. A solução foi bem misturada e colocada em freezer -20 °C por cerca de 1 hora. Após centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos, o pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70%, e em seguida, centrifugado a 11000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O etanol foi desprezado com cuidado e 50 µL de água estéril foram adicionados para solubilizar o DNA.

3.3 Análises por bioinformática (*in silico*) dos genes selecionados.

Os genes LIC10562 e LIC13259 foram selecionados com base nas análises realizadas *in silico*. O programa LipoP foi utilizado para avaliar a presença de sinal de clivagem ou lipidação (Juncker *et al.*, 2003) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>). Os domínios conservados foram avaliados pelo programa PFAM (Sonnhammer *et al.*, 1997) (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) e a localização celular pelo programa CELLO (Yu *et al.*, 2004) (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>).

3.4 Desenho dos primers

Para obtenção dos produtos de PCR foi desenhado um par de oligonucleotídeos de cada gene (LIC13259 e LIC10562), utilizando o programa Generunner. Com base no programa WebCutter, (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) sítios de restrição foram adicionados aos oligonucleotídeos para a clonagem no vetor de clonagem pGEM-T Easy e no vetor de expressão pAE (Ramos *et al.*, 2004).

3.5 Amplificação por PCR

Os fragmentos referentes aos genes LIC10562 e LIC13259 foram obtidos pela reação de PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, utilizando-se tampão de PCR; 0,2 mM dNTP; 2 mM de MgCl₂; 0,5 mM de cada oligonucleotídeo (F e R); 1 U Taq polimerase; 100 ng de DNA genômico. Os insertos foram amplificados sem a sequência do peptídeo sinal e foram adicionados os sítios de restrição aos oligonucleotídeos conforme mostrado na tabela 1.

A especificidade da amplificação e o tamanho das sequências de interesse foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA) corado com Gel Red™ (Biotium, Inc., Hayward, CA, EUA). Os insertos de interesse foram recortados do gel e purificados com o auxílio do kit “*GFX PCR DNA and gel band purification*” (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

Tabela 1 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes por PCR.

Gene ID	Oligonucleotídeo sintético	TA	Amplicon
LIC10562	F: 5' CTCGAGTGTCAAGCAGGAGAGACGATT 3'	55 °C	519 pb
	R: 5' AAGCTT TCAGTCCGAACCTTTTGATAGG 3'		
LIC13259	F: 5' CTCGAG TGTAACCAACCAACCCTGCT 3'	50 °C	438 pb
	R: 5' AAGCTT TTAATGTACTAGGTCCCCACAATC 3'		

Gene ID: identificação do gene no genoma de *L. interrogans* sorovar copenhageni. TA: temperatura de anelamento; pb: pares de base. Abreviaturas em inglês F - *Forward*, R - *Reverse*. As letras em negrito correspondem às sequências de enzimas de restrição (*XhoI* e *HindIII*).

3.6 Clonagem no vetor pGEM-T Easy

O vetor pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) (Figura 4) possui uma quebra de sequências com extremidades 3' T sobressalentes, o que possibilita a ligação do fragmento amplificado, uma vez que algumas polimerases acrescentam uma adenina a extremidade 3' do *amplicon*, possibilitando o anelamento e posterior ligação ao arcabouço açúcar-fosfato. A presença do inserto interrompe o gene Lac Z, o qual é essencial para a degradação de um substrato cromogênico, o X-gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo). Dessa forma, a seleção dos clones positivos se dá pela diferenciação azul/branco, uma vez que colônias positivas para o inserto são incapazes de degradar esse substrato e assim são visualizadas em branco.

Figura 4 - Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy. ori- origem de replicação. Amp^R– gene de resistência a ampicilina. LacZ- gene para metabolismo de lactose (β -galactosidase). MCS – sítio múltiplo de clonagem.

Fonte: Modificado Promega, 2016.

A reação de ligação foi realizada de acordo com a reação padrão estabelecida pelo fabricante. Os produtos de ligação foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* DH5 α ™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) competentes (Hanahan, 1983). Foram utilizados 5 μ L do produto de ligação para 50 μ L de bactérias competentes, que foram incubadas por 30 minutos em banho de gelo e, em seguida, submetidas a um choque térmico, por 2 minutos a 42 °C. Após o choque térmico, as amostras foram mantidas em banho de gelo por mais 5 minutos. Para recuperação das células, foram acrescentados 350 μ L de meio de cultura Luria Bertani – LB (0,5% de extrato de levedura, 1% triptona, 1% NaCl) e as amostras foram incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação. Após o processo de recuperação, as amostras foram plaqueadas em meio LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina, 100 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) e 50 mg/mL de X-gal e, em seguida, incubadas por 16 h a 37 °C.

As colônias brancas selecionadas foram inoculadas em meio LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina e incubadas por 16 h a 37 °C sob agitação. Para obtenção do DNA plasmidial (pGEM-T *Easy* contendo o inserto de interesse) utilizou-se o kit “*Plasmid prepmini spin*” (GE Healthcare) seguindo as orientações do fabricante. A presença dos fragmentos foi analisada por eletroforese em gel de agarose após a digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição correspondentes.

3.7 Clonagem no vetor de expressão pAE

Após confirmação da clonagem, os fragmentos foram removidos da construção pGEM-T *Easy*/inserto e inseridos no vetor de expressão pAE (Figura 5). Esse vetor permite expressar as proteínas recombinantes contendo uma sequência de 6 histidinas na região N-terminal (Ramos *et al.*, 2004), além de possuir um sistema de alta expressão controlada pelo promotor do fago T7, assim a expressão das proteínas recombinantes só ocorre na presença da enzima T7 RNA polimerase.

Figura 5- Mapa do vetor de expressão pAE. PT7- promotor. (HIS)6x- sequência codificadora para 6 resíduos de histidina. RBS- sítio de ligação ao ribossomo. ATG- códon de início de transcrição. Term- região de terminação de transcrição. F1 ori- origem de replicação. Amp^R – gene de resistência a

Fonte: Modificado (Ramos *et al.*, 2004).

Os fragmentos foram inseridos no vetor pAE previamente digerido. A ligação dos insertos ao vetor foi realizada em uma reação contendo proporção molar de 5:1 (inserto:vetor). Posteriormente, foram incubadas 5 U de T4 DNA ligase (Amersham Pharmacia Biotech, Inc), o inserto e o vetor por 16 h a 16 °C. Os produtos de ligação foram usados para transformar *E. coli* DH5 α . As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina e incubadas por 16 h a 37 °C. No dia seguinte, as colônias selecionadas foram inoculadas em meio líquido LB com 100 mg/mL de ampicilina e novamente incubados a 37 °C por 16 h sob agitação. Após o crescimento bacteriano, foi realizada a extração do plasmídeo e presença dos insertos de interesse como descrito acima.

3.8 Sequenciamento das construções pAE/inserto

Preparações plasmidiais dos clones positivos foram obtidos e o DNA foi submetido ao sequenciamento pelo método da terminação de cadeia (Sanger *et al.*, 1977), a partir dos primers T7 e pAER (abaixo), utilizando-se sequenciador automático ABI (PE AppliedBiosystems, Foster city, CA) para a conferência dos insertos. A reação de amplificação foi realizada de acordo com as recomendações da AppliedBiosystems, empregando 500 ng de DNA molde, 3,2 pmoles de oligonucleotídeos e 2 µL do tampão *BigDye®* (PE AppliedBiosystems) que contém ddNTPs 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 o auxílio dos programas públicos:

Chromas (<http://www.mb.mahidol.ac.th/pub/chromas.htm>)

Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>).

T7 “forward” TAATACGACTCACTATAGGG

pAE R“reverso”: CAGCAGCCAACTCAGTTCCT

3.9 Expressão das proteínas recombinantes

Três cepas de *E. coli* foram empregadas para ensaios de expressão: *E. coli* BL21(DE3), BL21 Star (DE3) pLysS (Invitrogen) e C43(DE3) (Avidis), que possuem o gene da T7 RNA polimerase controlado pelo promotor *lac UV5*, o qual é induzido por IPTG (isopropil-B-D-tiogalactopiranosídeo) (Studier, 1991). A cepa BL21 Star (DE3) pLysS (Invitrogen) possui um plasmídeo pLysS que expressa a enzima T7 lisozima, um inibidor da polimerase T7, reduzindo a expressão basal da proteína na ausência de indutor (Davanloo *et al.*, 1984). A linhagem C43 (DE3) contém mutações genéticas que a torna fenotipicamente estável e, por isso é usada para expressões de proteínas tóxicas (Miroux e Walker, 1996). Essas bactérias tornadas competentes foram transformadas com os plasmídeos recombinantes e cultivadas por 16 horas. O cultivo foi realizado em meio Luria-Bertani (LB) contendo 100 µg/mL de ampicilina, no caso da cepa BL21 Star (DE3) pLysS foi adicionado além de ampicilina, cloranfenicol ao meio, e incubados a 37 °C por 16 h. As culturas saturadas foram diluídas (1:20) em um novo meio, incubadas e monitoradas periodicamente por meio da leitura em espectrofotômetro até atingir densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 0,6 e 0,7,

que caracteriza o início da fase exponencial de crescimento. A indução foi realizada adicionando 1 mM de IPTG e mantido por 3 h a 37 °C.

Após o período de indução, as culturas foram centrifugadas por 15 minutos a 6000 rpm e a massa bacteriana obtida foi ressuspensa em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 200 µg/mL lisozima; 2mM PMSF e 1% Triton X-100) e incubada em gelo por 15 minutos e, em seguida, sonicada a 60Hz. O lisado foi centrifugado por 10 minutos a 7000 rpm à 4°C e o sedimento bacteriano formado foi ressuspensa em tampão de desnaturação (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 8 M ureia). Alíquotas do sobrenadante e sedimento bacteriano foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS, na presença de proteína de massa molecular conhecida (marcador). Após determinar a cepa mais favorável para a expressão das proteínas, esse procedimento foi realizado em escala maior para purificação destas proteínas recombinantes.

3.10 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 impregnada com níquel. A purificação da LIC13259 foi realizada a partir de 500 mL de cultura da cepa BL21 (DE3), no equipamento AKTA prime Plus (GE Healthcare). As frações obtidas foram coletadas e analisadas em gel de SDS-PAGE. As frações em que havia proteínas recombinantes foram dialisadas em tampão PBS pH 7,4, sendo realizadas três trocas do tampão de diálise em intervalos de 2 horas. A concentração da proteína recombinante foi estimada por análise densitométrica do *software* Gel Quant (2003) em comparação com massas conhecidas de BSA (*Bovine Serum Albumin*).

Para a LIC10562 foram empregadas diversas estratégias de purificação. Primeiramente a partir de 500 mL de cultura da cepa BL21 Star (DE3) pLysS a purificação foi realizada pelo equipamento AKTAprime Plus (GE Healthcare) da fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento bacteriano). No caso da fração insolúvel, o sedimento bacteriano formado após a centrifugação foi ressuspensa em 50 mL de tampão de desnaturação por cerca de 16 horas para garantir a total solubilização. A purificação da fração insolúvel foi realizada com a proteína desnaturada. As frações obtidas foram coletadas e analisadas em gel de SDS-PAGE. Outra estratégia utilizada foi a purificação a partir de 500 mL de cultura da cepa BL21 (DE3), cujo sedimento bacteriano foi ressuspensa e solubilizado em tampão de desnaturação, conforme descrito. Os métodos utilizados foram renaturação na

coluna, renaturação na diálise e renaturação por gotejamento. O primeiro consiste na adsorção da proteína recombinante à coluna em sua forma desnaturada, e então soluções contendo concentrações decrescentes de ureia são passadas na coluna para a remoção do agente desnaturante e consequente renaturação da proteína. A segunda metodologia consiste na purificação da proteína recombinante em sua forma desnaturada e então, as frações contendo proteínas foram dialisadas lentamente com concentrações decrescentes de ureia para a remoção do agente desnaturante e consequente renaturação da proteína. No terceiro método de purificação, o sedimento bacteriano solubilizado é diluído por gotejamento (fluxo de 1 mL por minuto) em 2 L de tampão de renaturação (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl), sob agitação, a fim de remover o agente desnaturante e renaturar a proteína. Em seguida, os 2 L de amostra diluída em tampão de renaturação é passado na coluna. Para todas as metodologias descritas, após a passagem das amostras na coluna, fez-se diferentes lavagens com o tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (5 mM, 20mM, 40mM e 60 mM) e por fim, a proteína foi eluída com a concentração final de 500 mM de imidazol. As frações obtidas foram coletadas e analisadas em gel de SDS-PAGE.

3.11 Dicroísmo circular (CD)

Amostras da proteína recombinantes foram dialisadas em tampão fosfato de sódio 20mM pH 7,4, o qual é apropriado para a análise por não conter íon cloro, e assim não interfere na leitura do equipamento. Os espectros de CD foram expressos em termos de elipticidade molar residual:

$$[\phi] = \phi \text{ (mdeg)} \times \mathbf{M} \text{ (Da)} / 10 \times \mathbf{C} \text{ (M)} \times \mathbf{I} \text{ (cm)} \times \mathbf{n},$$

onde ϕ é elipticidade, $\mathbf{M}$ é a massa molecular da proteína, $\mathbf{C}$ é a concentração da proteína e $\mathbf{I}$ é o caminho óptico e $\mathbf{n}$ é o número de resíduos da proteína. As medições de espectroscopia circular foram feitas a 20 °C em um espectropolarímetro 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 apresentando como uma média de cinco leituras em intervalos de 190 a 260 nm. Os espectros gerados foram submetidos para análise no programa CAPITO, que calcula o conteúdo de estrutura secundária da proteína a partir dos dados experimentais de elipticidade (Wiedemann *et al.*, 2013).

3.12 Estrutura tridimensional da proteína

A estrutura tridimensional da proteína LIC13259 foi modelada utilizando o servidor I-TASSER (Wu *et al.*, 2007) removendo a sequência correspondente ao peptídeo sinal. O servidor I-TASSER utiliza múltiplas estruturas cristalográficas para gerar cinco modelos. O melhor modelo foi selecionado a partir do maior valor do *C-Score*. A figura foi gerada utilizando o programa Pymol.

3.13 Imunização de camundongos para obtenção de anticorpo policlonal

Cinco camundongos BALB/c fêmeas (idade variando de 6 a 8 semanas) foram imunizadas com 10 µg de proteína recombinante ou PBS (controle negativo) em suspensão contendo Alhydrogel (2% Al(OH)₃, Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca) como adjuvante, na concentração final de 12%, por via subcutânea. Foram realizadas três imunizações com intervalos de duas semanas. Os animais foram sangrados via plexo retro-orbital em intervalos de 15 dias, referentes a cada imunização. O sangue coletado foi incubado a 37 °C por 30 minutos e depois a 4 °C por 30 minutos, sendo então centrifugados por 5 minutos a 5000 rpm, para separação do soro, o qual foi cuidadosamente coletado e armazenado a -20 °C.

3.14 Preparação do extrato de *E. coli*

Para preparação do extrato de *E. coli* foi utilizado a cepa BL21 (DE3), a mesma cepa em que a proteína recombinante foi expressa. A cepa selvagem foi inoculada em 400 mL de meio LB e deixada crescer por 16 h a 37 °C. Todo o volume de cultura saturada foi centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos, e o sedimento bacteriano resultante foi ressuspenso em 40 mL de tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 200 µg/mL lisozima; 2 mM PMSF e 1% Triton X-100) e lisado em banho de gelo, por sonicação. O extrato foi utilizado em experimentos nos quais foi necessário neutralizar anticorpos contra proteínas de *E.coli*.

3.15 Titulação de anticorpos

A presença de anticorpos policlonais específicos nos soros de camundongos imunizados com a proteína recombinante foi avaliada por ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Uma concentração de 250 ng/poço de proteína recombinante diluída em tampão carbonato foi adsorvida em placa de microdiluição por 16 h a 4 °C. Após incubação, as placas foram lavadas com PBS – Tween 0,05% (PBS-T) e então bloqueadas com a solução de bloqueio (PBS-T/leite desnatado 10%) por 2 h a 37 °C. Em outra placa, foi feita diluição seriada dos soros de camundongos em solução de bloqueio acrescida de extrato de *E.coli* (10% v/v), e então foram incubados por 1 h a 37 °C para adsorção dos anticorpos inespecíficos, ou seja, anticorpos gerados contra contaminantes de *E.coli* que podem estar contidos nas alíquotas de proteína recombinante purificada. Após a incubação, 50 µL das amostras adsorvidas foram transferidas para a placa e incubada por mais 1 h a 37 °C. Após esse período, a placa foi lavada com PBS-T e incubada por 1 h com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (*Sigma-Aldrich*) na diluição 1:5000. Após a incubação a placa foi lavada novamente, a revelação foi feita 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 um 1 µL/mL H₂O₂. A reação foi interrompida após 15 minutos com 50 µL/poço de H₂SO₄ 4 N. A intensidade da reação foi analisada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492 nm. O título de anticorpos foi considerado a maior diluição dos soros com valor DO_{492nm} maior ou igual a 0,1.

3.16 Detecção de anticorpos IgG em soros de paciente diagnosticados com leptospirose em fase inicial e fase convalescente da doença

A detecção de anticorpos IgG no soro de pacientes diagnosticados com leptospirose foi realizado por ELISA. A proteína recombinante foi imobilizada em placa de microdiluição (250 ng de proteína por poço diluída em tampão carbonato 0,1M pH 9,6). As placas foram incubadas por 16 h a 4 °C, e no dia seguinte foram lavadas 3 vezes com PBS-T, bloqueadas com PBS-T/leite e incubadas por 2 h a 37 °C. Os soros humanos foram empregados na diluição 1:100 e os mesmos foram adsorvidos por 1 h em extrato de *E. coli* 10% para remover anticorpos inespecíficos contra proteínas de *E.coli*. Em seguida, os soros foram transferidos para a placa de ELISA para interação com a proteína recombinante, por mais 1 h a 37 °C. O anticorpo secundário, anti-IgG humano conjugado com peroxidase, foi

usado na diluição 1:10000 e incubado por 1 h a 37°C. A revelação foi feita como já descrito anteriormente e a intensidade da reação foi analisada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492 nm. A reatividade de cada soro foi realizada em duplicata e os valores foram expressos como a média dos valores de absorbância. Para a determinação da frequência de pacientes positivos para a presença de anticorpos, foi utilizado como limiar o valor de corte (*cutoff value*), o qual foi baseado na densidade óptica de um pool de soro comercial (*Sigma-Aldrich*) de indivíduos não infectados. Assim, o valor do *cutoff* foi calculado como a média dos valores de absorbância apresentados pelos indivíduos somados a três vezes o desvio padrão. Valores acima do *cutoff* foram considerados positivos. Os soros de pacientes diagnosticados com leptospirose pertencem a uma soroteca do Instituto Adolfo Lutz e foram cedidos gentilmente pela Dra. Eliete C. Romero.

3.17 Preparo dos extratos proteicos de *Leptospira* spp.

Culturas de leptospiras previamente mencionadas foram crescidas por 1 semana e então 20 mL foram centrifugados por 20 minutos a 6000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com PBS *Low-salt* (PBS_{LS}). O sedimento resultante foi ressuspensionado em PBS, sendo esta alíquota empregada como extrato proteico total de *Leptospira*.

3.18 Separação das proteínas por *Imunoblotting*

As proteínas ou extratos a serem avaliados foram separados por SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose “Hybond – ECL” (GE Healthcare) em sistema semi-úmido em tampão de transferência (Tris-glicina acrescido de 1,85 % de SDS). A eficiência da transferência foi avaliada por coloração de *Ponceau S* (*Sigma – Aldrich*). A membrana foi então lavada e incubada com solução de bloqueio (PBS-T/leite desnatado 10%) por 16 horas a 4 °C. Após o bloqueio, a membrana foi lavada e incubada com anticorpo monoclonal anti-his (*Sigma-Aldrich*) diluído 1:10000. As proteínas recombinantes também foram detectadas com anticorpos policlonais produzidos em camundongos. Nesse caso, a diluição do anticorpo utilizado foi de 1:5000, diluição correspondente a uma DO_{492nm} de 1. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada com PBS-T e incubada por 1h em temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo

conjugado com peroxidase (*Sigma-Aldrich*) na diluição 1:5000. Por fim, a membrana foi lavada e as proteínas foram detectadas utilizando kit ECL *Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare). A quimioluminescência da reação foi detectada com o auxílio do *software Carestream Molecular Imaging* (Carestream Health, Inc.) acoplado ao aparelho Gel Logic 2200 PRO.

3.19 Ensaio de localização da proteína nativa nas leptospiplas intactas

Foram utilizados 10 mL de cultura das cepas patogênicas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa atenuada (M20) e da *L. biflexa* sorovar Patoc cepa não patogênica Patoc 1. As bactérias foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos e o sedimento bacteriano foi lavado com PBS – *low salt* (PBS *ls*) contendo 1% de BSA. Foi distribuído 400 µL em tubos e incubados com anticorpo contra DnaK (proteína citoplasmática), contra PBS na diluição 1:1000 e contra proteína recombinante na diluição 1:200 por 2 h em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS *ls* e incubados por 1 h e 30 min com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC, *Sigma-Aldrich*) diluído 1:100 em uma solução de PBS *ls* com 1% BSA. Após esse período, a solução foi centrifugada e o sedimento bacteriano foi lavado duas vezes com PBS *ls*. As bactérias foram ressuspensas em 400 µL de PBS *ls* e distribuídos em placa preta. A intensidade de fluorescência foi lida no equipamento Fluoroskan Ascent FL (*Thermo Scientific*), excitação 485 nm, emissão 538 nm.

3.20 Ensaio de Imunofluorescência

A localização celular das proteínas foi analisada por imunofluorescência. Para isso, cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa patogênicas atenuadas (M20) foram centrifugadas a 6000 rpm por 15 minutos. O sedimento bacteriano foi lavado três vezes com PBS contendo 50 mM NaCl (PBS *ls*) e após centrifugação por mais 15 minutos a 6000 rpm, foi ressuspensado em uma solução de 200 µL contendo 2% de paraformaldeído e incubado por 40 minutos a 30 °C sob agitação. Após a incubação, as amostras foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 6000 rpm, e o sedimento bacteriano resultante foi ressuspensado em uma solução PBS *ls* com 5% de BSA contendo antissoro gerado contra LipL46 (proteína de membrana externa), PBS e contra proteína recombinante na diluição 1:50 por 2 h a 30 °C. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS *ls* acrescido de 5% de BSA

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

3.21 Ensaio de acessibilidade por proteinase K (PK)

A digestão enzimática das proteínas localizadas na superfície de *L. interrogans* cepa L1-130 foi feita segundo protocolo descrito por Pinne e Haake (2009), com algumas modificações. Foi utilizada cultura de leptospira crescida por uma semana, centrifugadas (6000 rpm por 15 minutos) e ressuspensas em tampão de proteólise, contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 5 mM CaCl₂, compondo um total de 10⁸ leptospiros/mL por tratamento. As bactérias foram incubadas com 40 µg/mL de proteinase K (PK, *Sigma-Aldrich*) a 37 °C sob leve agitação por 0h (representando o tempo sem degradação de proteínas), 0,5 h, 1 h e 2 h. Quando os períodos de incubação foram atingidos, a atividade da PK foi cessada por meio da adição de 2 mM de PMSF, um inibidor de serino-protease, e as bactérias centrifugadas e ressuspensas em 100 µL de PBS/*ls*.

As amostras dos diferentes tratamentos foram colocadas em câmara de *Petroff-Hausser* para contagem em microscópio de campo escuro, com o propósito de normalizar a quantidade de bactéria por amostra. Estas foram aquecidas a 96 °C por 5 min e separadas em gel de SDS-PAGE. Seguiu-se a transferência para membrana de nitrocelulose, o bloqueio com PBS-T/10% leite desnatado e, posteriormente, a detecção com antissoros. Os antissoros específicos utilizados foram produzidos contra as proteínas recombinantes LIC13259, LipL46 (controle positivo) e DnaK, utilizada como controle negativo por se tratar de uma proteína citoplasmática. Para os controles, o antissoro foi usado na diluição 1:1000, enquanto para a proteína LIC13259 foi utilizado na diluição 1:50.

3.22 Componentes biológicos

As seguintes macromoléculas empregadas nos estudos de interação foram compradas da empresa Sigma (*Sigma-Aldrich* Corporate, St Louis, MO, EUA): Vitronectina, fibrinogênio humano, Laminina e Colágeno tipo IV, derivados do sarcoma murinho da membrana basal Engelbreth-Holm-Swarm. Fibronectina celular derivada de fibroblastos humanos. Fibronectina plasmática e colágeno tipo I, isolados de cauda de rato. BSA e fetuína, utilizados como controle negativo. Plasminogênio e Fator H foram comprados da EMD Chemicals, Inc (São Diego, CA, EUA). Enquanto, C4BP e componentes do sistema complemento foram comprados da Complement Technology, Inc. (Tyler, Texas, EUA).

3.23 Interação da proteína recombinante a componentes da matriz extracelular, plasma e do sistema complemento

As macromoléculas empregadas no estudo foram diluídas em PBS 1x e 1 µg por poço foram adsorvidas em placas de ELISA e incubadas por 16 h a 4 °C para imobilização. Após esse período, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e bloqueadas com PBS-T contendo 1% de BSA por 2 h a 37 °C. A solução de bloqueio foi descartada e as placas foram novamente lavadas. Foi incubado 1 µg de proteína recombinante diluído em solução de bloqueio por 2 h a 37 °C e posteriormente foram lavadas. A detecção das proteínas recombinantes ligadas aos componentes foi feita com o *pool* de soro policlonal específico para a proteína recombinante, empregado na diluição 1:5000. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C, novamente lavadas e adicionados anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição 1:10000 por 1 h a 37°C. A reação foi revelada com substrato OPD como descrito anteriormente. Para confirmar a ligação o mesmo experimento foi realizado e a reatividade foi avaliada pelo uso anticorpo contra cada componente. Para aqueles componentes aos quais foi verificada a ligação significativa das proteínas recombinantes, foi realizado um ELISA, no qual 1 µg de proteína recombinante diluído em PBS 1x foi imobilizado em placas de microdiluição. No dia seguinte, as placas foram lavadas e bloqueadas, conforme descrito acima. Foi incubado 1 µg de cada componente diluído em solução de bloqueio por 2 h a 37 °C. A detecção dos componentes ligados a proteína recombinante foi realizada com um anticorpo primário contra cada componente e, em seguida, incubado com o anticorpo secundário específico. A reação foi revelada conforme já descrito. Esses experimentos foram realizados em triplicata para cada componente, e a

atividade basal foi avaliada em um poço pela ausência de proteína ou componente. Para análise estatística a média dos valores de absorbância de cada componente foi comparada com a média apresentada pelos controles negativos por meio do teste *t-Student*. O p-valor apresentado refere-se ao controle negativo BSA e fetuína e foi considerado significativo um p-valor abaixo de 5%.

3.24 Curva de dose-resposta da ligação das proteínas recombinantes aos componentes

Para aqueles componentes aos quais foi verificada ligação significativa das proteínas recombinantes, foi realizada uma curva de dose-resposta para verificar a afinidade de ligação. Para tal, 1 µg de cada componente ou BSA, como controle negativo foram imobilizados em placas de ELISA e incubados por 16 h a 4 °C. No dia seguinte as placas foram lavadas e bloqueadas conforme descrito acima. Após o bloqueio, foram adicionadas concentrações crescentes de proteína recombinante, diluídas em solução de bloqueio, e a reação prosseguiu conforme descrito acima. Quando a saturação foi atingida, os valores de absorbância foram utilizados para calcular a constante de dissociação (K_D) de acordo com o método descrito por (Lin *et al.*, 2009), com base na equação $K_D = (A_{max} \cdot [proteína]/A) - [proteína]$, na qual A é a absorbância em uma determinada concentração da proteína, A_{max} é a absorbância máxima para o leitor de placas de ELISA, que é obtida na saturação da ligação, [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.

3.25 Ensaio de inibição da ligação pela desnaturação térmica da proteína recombinante

Para verificar o efeito da desnaturação das proteínas recombinantes na interação aos componentes, as proteínas (10 µg/mL) foram submetidas à temperatura de 100 °C por 10 minutos. Em seguida, essas proteínas foram incubadas em placas de microdiluição, onde os componentes foram previamente imobilizados. A detecção da ligação foi realizada conforme descrito para o ensaio de adesão.

Para as análises estatísticas, a média dos valores de absorbância pela ligação das proteínas desnaturadas foi comparada à média dos valores de absorbância obtida pela ligação das proteínas não desnaturadas pelo teste *t-Student*. Um p-valor menor que 5% foi considerado estatisticamente significativo.

3.26 Caracterização da ligação da proteína recombinante à laminina

Laminina foi diluída em tampão contendo 50 mM de acetato de sódio pH 5,0 na concentração final de 10 µg/mL e imobilizadas em placa de ELISA. Em seguida, a laminina imobilizada foi tratada com metaperiodato de sódio (*Sigma-Aldrich*) nas concentrações de 0 a 100 mM por 1 h a temperatura ambiente, de modo que ocorresse a oxidação dos resíduos de açúcares na macromolécula. Após o tratamento, as proteínas recombinantes foram adicionadas aos poços na concentração de 2,5 µg/poço, e a reação foi realizada conforme descrito anteriormente. Para as análises estatísticas, a média dos valores de absorbância obtida pela ligação das proteínas recombinantes à laminina oxidada foi comparada com a média dos valores de absorbância obtidos pela ligação das proteínas a laminina sem oxidação pelo teste *t-Student* e um p-valor menor que 5% foi considerado estatisticamente significativo.

3.27 Caracterização da ligação da proteína recombinante ao plasminogênio

Para avaliar a importância dos resíduos de lisina na interação da proteína recombinante com o plasminogênio, a proteína foi diluída 25 µg/mL em tampão contendo concentrações de 2 e 20 mM do ácido-6-aminocaprílico (*ACA-Sigma-Aldrich*), o qual é análogo de lisina. As soluções foram adicionadas aos poços nos quais o plasminogênio havia sido imobilizado. A interação da proteína recombinante com o plasminogênio na presença de ACA foi detectada com o antissoro específico para a proteína recombinante, conforme descrito anteriormente. Para as análises estatísticas, a média dos valores de absorbância obtidos pela proteína incubada com ACA foi comparada com a média dos valores de absorbância obtidos pela ligação da proteína na ausência do competidor pelo teste *t-Student* e um p-valor menor que 5% foi considerado estatisticamente significativo.

3.28 Ensaio de atividade enzimática da plasmina

Este experimento foi realizado para verificar se o plasminogênio ligado à proteína recombinante consegue ser convertido à sua forma enzimaticamente ativa, a plasmina. Para isso, o procedimento foi realizado conforme proposto por (Vieira *et al.*, 2009). Em suma, as placas de ELISA foram incubadas com 1 µg por poço de proteína ou BSA, empregado como controle negativo. Após a incubação por 16 h a 4 °C, processo de lavagem e bloqueio com

PBS-T acrescido de 1% BSA, foi adicionado 1 µg de plasminogênio por poço para permitir a interação com as proteínas recombinantes. Em seguida, as placas foram lavadas e a cada poço 4 ng de ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA – *Sigma-Aldrich*) e 0,4 nM do substrato cromogênico para plasmina (*D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride* – *Sigma-Aldrich*). Foram utilizados como controles a omissão de um dos componentes (Plasminogênio, uPA ou substrato). As placas foram incubadas por 16 h a 37 °C e a degradação do substrato foi medida por meio de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm. Para as análises estatísticas, teste *t-Student* foi utilizado para comparar a média dos valores de absorbância obtida para o tratamento completo com a proteína com a média dos valores de absorbância obtidos pela com BSA. Um p-valor menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3.29 Caracterização da ligação da proteína recombinante aos componentes do sistema complemento

Para avaliar a participação dos domínios de heparina na interação da proteína recombinante com os componentes, a proteína foi diluída 25 µg/mL em tampão contendo concentrações crescentes de heparina (0 a 500 µg/mL) (*Sigma-Aldrich*). As soluções foram adicionadas aos poços, os quais foram previamente imobilizados com componente (Vitronectina, C7, C8 ou C9). A interação da proteína recombinante com os componentes na presença ou ausência de heparina foi detectada com o antissoro contra a proteína recombinante, conforme já descrito. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste *t-Student* para comparar a média dos valores de absorbância obtidos pela proteína incubada com heparina e a média dos valores de absorbância obtidos pela interação da proteína na ausência do competidor. Um p-valor menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3.30 Recrutamento de plasminogênio e componentes do sistema complemento a partir do soro humano

Proteína recombinante (25 µg/mL) ou gelatina (10 µg/mL) foram imobilizadas em placas de ELISA. Os poços foram lavados três vezes com PBS-T e bloqueados por 40 minutos a temperatura ambiente com solução de bloqueio *SuperBlock T20* (TBS) (*Thermo Scientific*). Após o bloqueio, soro humano normal (NHS) (*Sigma-Aldrich* ou *Complement Technology*) foram incubados em concentrações de 0 a 30% por 90 minutos a temperatura

ambiente. Após o processo de lavagem, a ligação da proteína recombinante aos componentes foi detectada por anticorpo contra cada componente. A reação prosseguiu conforme descrito anteriormente e a absorbância foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm.

3.31 Ensaio de polimerização de C9

Para avaliar o efeito da proteína na polimerização de C9, diferentes concentrações de rLIC13259 (1,25 µg; 2,5 µg e 5 µg) foram incubadas com C9 (3 µg/µL) em tampão Tris-HCl (20 mM pH 7,4) por 40 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 50 µM de ZnCl₂, o qual é responsável por induzir a polimerização de C9, à solução e incubado por 2 horas a 37 °C. As amostras, foram então separadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida de gradiente (4 a 20%) (Bio-Rad, Hercules, CA) e corados com azul de comassie. Foram usados como controle positivo de polimerização C9 incubado com ZnCl₂ e a proteína BSA, a qual não se liga a C9. Como controle negativo foi usado C9 sem incubação com ZnCl₂.

3.32 Comitê de Ética animal e humano

Todos os estudos com animais foram aprovados pelo comitê de ética do Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil, sob o protocolo CEUA nº 4330120116. O Comitê de Pesquisa Animal no Instituto Butantan adota o guia do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. O presente trabalho também foi analisado pela CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais e pela CEPISH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, sob o protocolo CEP-ICB nº 807/2016.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de bioinformática dos genes selecionados

As leptospiros possuem uma grande variedade de lipoproteínas e proteínas de membrana que podem estar mediando o contato com o hospedeiro e contribuindo para a sobrevivência da bactéria no meio ambiente. Assim, com o objetivo de caracterizar novos genes de leptospiros, neste trabalho selecionamos dois genes de *L. interrogans* sorovar

Copenhageni com base nas análises *in silico*. Segundo o *software* LipoP (Juncker *et al.*, 2003), os genes LIC13259 e LIC10562 selecionados, codificam proteínas que possuem sítio de clivagem e que, possivelmente, serão destinados à membrana externa de *Leptospira*. Ambos os genes possuem sinal SPII, tratando-se, portanto, de possíveis lipoproteínas, uma vez que essa região é reconhecida pela enzima peptidase sinal II, responsável pela clivagem do peptídeo sinal e por lipidação de resíduos de cisteína. Além disso, o *software* CELLO foi utilizado para prever a localização celular das proteínas, por meio de algoritmo funcional para bactérias gram-negativas. Com base nos resultados, ambas as proteínas possuem alta probabilidade de estarem alocadas no espaço periplasmático da bactéria. No entanto, devido à sequência lipobox das espiroquetas exibirem maior plasticidade do que de qualquer outra bactéria, a aplicação de algoritmos de predição existentes para dados de sequência de leptospira tem sido problemático. Desse modo, a predição pelo programa LipoP possui maior relevância, uma vez que este software foi treinado especificamente para o lipobox de espiroquetas.

As duas proteínas codificadas pelos genes em estudo foram identificadas no trabalho de proteômica quantitativa que foi realizado com a cepa *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (virulenta), porém não foram possíveis de serem quantificadas, possivelmente, o número de cópias estava abaixo do limite de detecção (Malmström *et al.*, 2009).

A presença de domínios proteicos, responsáveis por desempenhar uma função específica também foi avaliado. Essas análises são importantes uma vez que diversas proteínas presentes na superfície celular possuem em sua estrutura domínios conservados. Para tanto, o programa PFAM (Sonnhammer *et al.*, 1997) foi utilizado e segundo os resultados gerados apenas a proteína codificada pelo gene LIC13259 apresentou um domínio chamado DUF3347, o qual é um domínio de função desconhecida até o presente momento.

A tabela 2 mostra resumidamente a análise por bioinformática dos genes selecionados para o estudo.

Tabela 2 - Resumo das análises por bioinformática.

Gene ID	Localização celular segundo CELLO	Sítio de clivagem LipoP	Domínio Conservado PFAM	Número de cópias
LIC13259	Periplasmática	SPII 26-27	DUF3347	ND
LIC10562	Periplasmática	SPII 20-21	-	ND

Notas: Gene ID: identificação do gene no genoma *L. interrogans* sorovar Copenhageni; ND: não determinado.

4.2 Análise da presença dos genes entre as diversas espécies e sorovares de *Leptospira*

As leptospiros são bactérias com grande variabilidade antigênica devido à resposta heterogênea aos lipopolissacarídeos presentes em sua superfície. Desse modo, proteínas que sejam conservadas em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* são importantes para o estudo de um potencial alvo vacinal. Para avaliar a similaridade das sequências estudadas com outras espécies e sorovares de *Leptospira* a ferramenta BLAST *Protein* foi utilizada (Altschul *et al.*, 1997). A visualização do grau de similaridade foi observada após a realização de alinhamento múltiplo com as sequências ortólogas. Dessa forma foi gerado um cladograma a partir das sequências de aminoácidos, ilustrado na figura 6. Os cladogramas foram construídos com referência na proteína codificada pela espécie patogênica *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. A partir do programa BLAST *Protein*, foram selecionadas sequências em modo fasta, as quais foram alinhadas por grau de similaridade, pelo programa Clustal Omega, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Nos cladogramas gerados, pode-se observar a similaridade das proteínas codificadas pelos genes LIC10562 (Fig. 6A) e LIC13259 (Fig. 6B) com as respectivas proteínas de cepas patogênicas, principalmente. Essa similaridade diminui ao comparar com proteínas de cepas intermediárias (em azul) e mais ainda quando comparado com as cepas saprofíticas (em verde). Com base nesses resultados, é possível inferir que as proteínas em estudo são bastante conservadas em espécies patogênicas, além de possuírem similaridades abaixo de 50% em espécies saprofíticas, o que sugere um possível envolvimento na virulência do patógeno.

Figura 6- Cladogramas obtidos pelo software Clustal Omega por alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos disponíveis no GenBank. O cladograma foi construído com base na proteína codificada pela espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 que está destacado por um retângulo. As porcentagens indicam a identidade da cepa em relação à cepa de referência. **(A)** refere-se ao gene LIC10562, **(B)** ao gene LIC13259. Em verde estão representadas as espécies saprofíticas, em azul estão representadas as espécies intermediárias e em vermelho, as patogênicas.

4.3 Clonagem e expressão dos genes selecionados

As sequências de DNA correspondentes aos genes LIC10562 e LIC13259 foram amplificadas a partir do DNA genômico extraído da cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni pela técnica de PCR, utilizando os oligonucleotídeos descritos na tabela 1. Os produtos de PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose e apresentaram o tamanho esperado de 519 pb e 438 pb, respectivamente (dados não mostrados). Em seguida, os fragmentos de DNA obtidos pela reação de PCR foram utilizados para a subclonagem em vetor pGEM-T *Easy*. Após transformação em bactérias competentes, clones positivos foram selecionados pela técnica azul/branco para a extração de DNA plasmidial, em seguida, foram digeridos com as enzimas de restrição que reconhecem os sítios inseridos nas extremidades 5' dos oligonucleotídeos, para certificação da presença dos insertos.

Os insertos removidos dos plasmídeos recombinantes (pGEM-T *Easy*/inserto) por ensaio de restrição foram purificados do gel de agarose. Em seguida, os insertos foram clonados no vetor de expressão pAE. Após transformação em bactérias competentes, foram selecionados alguns clones, os quais foram submetidos ao ensaio de restrição, confirmando a presença do inserto. Clones supostamente positivos foram submetidos à análise de sua sequência. Assim, após o sequenciamento confirmou-se que as sequências estavam em fase correta de leitura e não possuíam quaisquer tipos de mutações (anexo 1).

4.4 Expressão das proteínas recombinantes

Para obtenção das proteínas recombinantes envolvidas neste estudo, foi realizado um estudo de indução em diferentes cepas de *E. coli* BL21 (DE3), BL21 Star (DE3) pLysS e C43 (DE3). Assim, *E. coli*, tornadas previamente competentes por transformação por choque térmico, foram transformadas e a expressão das proteínas recombinantes foram induzidas por IPTG. Após a indução, as culturas foram lisadas e separadas em duas frações, solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento). Os resultados foram analisados em gel SDS-PAGE (Figura 7). O perfil de expressão não foi visualizado facilmente, apesar dos indícios observados nas cepas testadas. Desse modo, para confirmar o perfil de expressão gerado pelas diferentes cepas, as proteínas foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-His e visualizadas por *immunoblotting*.

Figura 7- Análise da expressão das proteínas recombinantes em diferentes cepas de *E. coli* por meio de SDS-PAGE 15%. Géis dos testes de expressão em diferentes cepas para as proteínas **(A)** LIC10562 e **(B)** LIC13259. 1: padrão de massa molecular; 2: extrato total não induzido; 3: extrato total induzido; 4: sobrenadante; 5: sedimento bacteriano.

Os resultados obtidos no *Imunoblotting* mostram que as proteínas recombinantes foram expressas nas cepas testadas, com exceção a rLIC10562 que não obteve perfil de expressão na cepa C43 (DE3). A proteína rLIC10562 foi expressa principalmente na fração insolúvel da cepa BL21 (DE3) (Figura 8A). Por outro lado, a proteína rLIC13259 foi expressa majoritariamente na fração solúvel na cepa BL21 (DE3) (Figura 8B).

Figura 8 - Análise da expressão das proteínas recombinantes em diferentes cepas de *E. coli* por imunoblotting utilizando anticorpo anti-His. As frações de interesse foram separadas por SDS-PAGE e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-His conjugado com peroxidase para detecção das proteínas recombinantes. **(A)** LIC10562 e **(B)** LIC13259. 1: extrato total não induzido; 2: extrato total induzido; 3: sobrenadante; 4: sedimento bacteriano.

Na tabela 3 estão descritos os resultados dos cálculos de massa molecular esperada e ponto isoelétrico (PI) teórico das proteínas recombinantes que foram realizados a partir da composição de aminoácidos, utilizando o programa ProtParam - <http://web.expasy.org/protparam/>.

Tabela 3 - Massa molecular e PI teórico das proteínas recombinantes.

Gene ID	Massa molecular (kDa)	PI teórico
LIC13259	17	6,12
LIC10562	21	8,55

Nota: Gene ID: identificação do gene no genoma *L. interrogans* sorovar Copenhageni; PI: ponto isoelétrico.

4.5 Purificação e diálise das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas recombinantes expressas em *E. coli* foi feita por cromatografia de afinidade ao metal, com a resina *Chelating Sepharose* (GE Healthcare) tratada com níquel em sua forma catiônica. Como o vetor de expressão pAE adiciona uma sequência de seis resíduos de histidinas na extremidade N-terminal da proteína recombinante, esta se liga a resina impregnada com níquel, via anel imidazólico presente na cadeia lateral da histidina, ao passo que os contaminantes proteicos da cultura são removidos por lavagens contendo tampões contendo baixa concentração de imidazol. A proteína recombinante é eluída, por competição, em tampão contendo alta concentração de imidazol.

Como a rLIC10562 foi obtida majoritariamente na fração insolúvel da cepa *E. coli* BL21 (DE3) foram realizadas diversas metodologias de purificação. As frações foram eluídas e analisadas por SDS-PAGE. Os resultados obtidos mostram que embora alguma banda tenha sido notada, após o processo de diálise a proteína não foi recuperada (Figura 9). Nesta etapa, a continuidade do estudo com a rLIC10562 foi interrompida, uma vez que não foi possível purificá-la pelos métodos disponíveis no laboratório.

Figura 9- Análise da proteína após purificação da proteína recombinante LIC10562. (A) Purificação a partir do sedimento bacteriano da cultura de *E. coli* BL21 (DE3) com renaturação na diálise. (B) Purificação a partir do sedimento bacteriano da cultura de *E. coli* BL21 (DE3) com renaturação por gotejamento. (C) Purificação a partir do sedimento bacteriano da cultura de *E. coli* BL21 (DE3) com renaturação na coluna. 1: padrão de massa molecular, 2-6: amostras após a eluição.

A rLIC13259 foi purificada pelo aparelho AKTA *prime Plus* (GE Healthcare) a partir do sobrenadante da cultura de *E. coli* BL21 (DE3) obtido após a lise bacteriana. As proteínas recombinantes foram eluídas e analisadas por SDS-PAGE 12%. (Figura 10A). Após diálise em tampão PBS pH 7,4, para a retirada de imidazol, a concentração da proteína recombinante foi estimada por análise densitométrica em comparação com massas conhecidas de BSA, com uso do software GelQuant (DNR Bio-Imaging Systems Ltda). A concentração

obtida após quantificação da rLIC13259 foi 0,65 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 0,29 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,22 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figura 10B).

Figura 10- Análise da proteína após purificação e quantificação da proteína recombinante LIC13259. (A). 1: padrão de massa molecular; 2,3 e 4: amostras após a eluição. Estimativa da concentração da proteína recombinante (B). 1: padrão de massa molecular, 2,3 e 4: amostras após diálise, 5-8: BSA contendo as massas de 4, 2, 1 e 0,5 μg . As bandas da proteína recombinante foram comparadas por densitometria com as bandas de BSA, para cálculo da concentração das alíquotas de proteína.

4.6 Avaliação dos estados oligoméricos da proteína recombinante

Com o objetivo de verificar a presença de estados oligoméricos da proteína recombinante, a rLIC13259 purificada foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e não desnaturantes. Os resultados obtidos sugerem a possível formação do estado dimérico da proteína recombinante LIC13259, uma vez que em condições não desnaturantes é possível observar uma banda com tamanho molecular de aproximadamente 34 kDa, além da banda de 17 kDa correspondente ao tamanho esperado da proteína. Essa mesma banda de 34 kDa não é observada em condições desnaturantes (Figura 11).

Figura 11 - Avaliação dos estados oligoméricos da proteína recombinante LIC13259. 1: padrão de massa molecular; 2: amostra da proteína recombinante purificada separada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes; 3: amostra da proteína recombinante purificada separada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes.

4.7 Avaliação da estrutura secundária por dicroísmo circular

Após a obtenção da proteína recombinante LIC13259 purificada, o dicroísmo circular (CD) foi realizado com o intuito de analisar estruturas secundárias presentes na proteína (Wiedemann *et al.*, 2013). Na literatura é demonstrado que as proteínas com estruturas predominantes em α -hélice apresentam duas faixas negativas, uma em aproximadamente 208 nm e outra em 220 nm e uma faixa positiva a 193 nm. Por outro lado, as proteínas com predomínio de folhas β apresentam uma faixa negativa em aproximadamente 218 nm e uma faixa positiva em 195 nm (Ranjbar e Gill, 2009) (Figura 12B). Assim, a proteína recombinante foi dialisada novamente em tampão apropriado. Os resultados obtidos a partir dos espectros gerados pelo programa CAPITO (Wiedemann *et al.*, 2013) sugerem que a proteína rLIC13259 apresenta um predomínio de α -hélice, uma vez que apresenta duas faixas negativas, aproximadamente em 208 nm e 220 nm e uma faixa positiva aproximadamente em 193 nm (Figura 12A). Além disso, foram realizadas previsões computacionais pelo software psipred e modelagem molecular pelo programa I-TASSER. A

figura foi gerada utilizando o programa Pymol (Figura 12C). Os resultados obtidos computacionalmente corroboram com os resultados experimentais obtidos por dicroísmo circular, como demonstrado na tabela 4. Com base nos resultados obtidos por predições computacionais e dados experimentais foi possível verificar que a proteína rLIC13259 apresentou um perfil estruturado e os dados preditos com base na sequência de aminoácidos corroboram com os dados experimentais obtidos a partir do dicroísmo circular. Portanto, os dados obtidos foram importantes para nos dar segurança em prosseguir os experimentos de caracterização de função e imunogenicidade da proteína recombinante em estudo.

Figura 12- Espectro gerado pela análise de dicroísmo circular. Espectro de dicroísmo circular gerado para a proteína rLIC13259 (A). As medições de espectroscopia circular foram feitas a 20°C em um espectropolarímetro. O espectro foi medido usando uma célula de 1 mm a intervalos de 0,5 nm, e apresentando uma média de cinco leituras. Espectros característicos de proteínas com predomínio de determinada estrutura secundária (B). A cor amarela indica padrão para predomínio de α -hélice, a cor azul padrão para folhas β e a cor vermelha para estruturas randômicas. (C) Figura gerada utilizando o programa Pymol a partir da modelagem molecular realizada pelo servidor I-TASSER.

Tabela 4 - Estrutura secundária predita com base em diferentes programas e detectada por dicroísmo circular.

Método	α-hélice	Folha β
Computacional		
Psipred	99%	1%
I-TASSER	100%	-
Experimental		
Dicroísmo circular	100%	-

4.8 Avaliação da atividade imunológica da proteína recombinante LIC13259 em camundongos BALB/c

Para avaliar a capacidade da proteína recombinante em estimular o sistema imune de forma específica, camundongos BALB/c foram imunizados pela via subcutânea com três doses de 10 μ g de proteína recombinante, adsorvidos em 2% de *Alhydrogel*, utilizado como adjuvante, em intervalos de 15 dias. Duas semanas após cada dose esses animais foram sangrados via retro orbital e os soros obtidos foram avaliados. Os dados apresentados na figura 13A mostram que a proteína recombinante LIC13259 foi capaz de induzir uma resposta imune humoral e apresentou um título de 327.680 após a 3ª imunização. Os anticorpos gerados foram capazes de reconhecer a proteína recombinante, o que é demonstrado pela presença de uma banda majoritária referente à proteína rLIC13259 no ensaio de *Imunoblotting*. Além da banda de 17kDa, referente ao tamanho esperado da proteína rLIC13259, nota-se a presença de uma banda superior, reforçando a formação de dímero da proteína recombinante (Figura 13B).

Figura 13- Produção de anticorpos IgG após imunização de camundongos com a proteína recombinante. (A) 15 dias após cada imunização, os animais foram sangrados e foi realizado a detecção de anticorpos IgG anti-rLIC13259. As barras indicam a média do log₁₀ do título dos animais $\pm$ o desvio padrão. (B) Visualização da reatividade dos anticorpos gerados contra as proteínas recombinantes por *imunoblotting*. A proteína foi eletrotransferida para membrana de nitrocelulose, e incubada com antissoro específico para a proteína, seguida da incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase para a detecção.

4.9 Reatividade da proteína recombinante com soro de pacientes

Com o objetivo de avaliar se a proteína estudada é reconhecida pelo soro de pacientes com leptospirose a reatividade desta, frente a esses soros foi estudada. A reatividade da proteína foi avaliada com amostras de soros de ambas as fases da doença, ou seja, na fase inicial (MAT -) e na fase convalescente (MAT +). Um total de 20 amostras pareadas foram analisadas e consideradas reativas quando apresentaram valores maiores do que o estabelecido pelo *cutoff*, calculado a partir da reatividade de um *pool* de soros de indivíduos saudáveis comerciais. Sendo assim, a reatividade para a proteína rLIC13259 foi de 5% na fase MAT - e 20% na fase MAT + (Figura 14). Estes resultados sugerem que a proteína LIC13259 é parcialmente reconhecida e possivelmente seja expressa na fase convalescente da doença. A baixa reatividade observada, pode ainda sugerir algum mecanismo de escape de reconhecimento imune, semelhante ao observado com a LIC10508. Essa proteína apresenta propriedades de interação com diferentes componentes do hospedeiro. No entanto, foi pouco reconhecida por soro de pacientes infectados quando comparado com as proteínas LIC10507 e LIC10509 (Siqueira, Teixeira, *et al.*, 2016).

Figura 15- Reatividade da proteína rLIC13259 com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose. Visualização da reatividade da proteína recombinante com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose na fase MAT – ou MAT + e controle negativo (NHS). A proteína foi eletrotransferida em duplicata (linhas 1 e 2) para membrana de nitrocelulose, as quais foram incubadas com pool de soros de pacientes (MAT- ou MAT +) e NHS e detectadas com anticorpo anti-IgG de humano conjugado com peroxidase.

4.10 Presença da proteína nativa em diferentes espécies de *Leptospira* spp.

Com o propósito de confirmar se o gene selecionado quando codificado é de fato expresso, extrato proteico total de leptospiros foi obtido e utilizado para detecção da proteína LIC13259 por *Western Blotting*. Inicialmente, foi avaliada a presença da proteína nativa LIC13259 nos extratos de *L. interrogans* sorovar Copenhageni Fiocruz L1-130 (cepa virulenta), *L. interrogans* sorovar Copenhageni M20 (cepa atenuada) e *L. biflexa* sorovar Patoc Patoc 1 (cepa saprofítica), visto que, a identificação de proteínas conservadas entre diferentes cepas é um critério importante para seleção de candidatos vacinais (Haake *et al.*, 1999; Feldman e Anderson, 2014).

Os extratos proteicos foram separados em SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com antissoro anti-rLIC13259. Em seguida, anticorpos anti-IgG conjugado com peroxidase foram utilizados. É possível verificar na figura 16, a reatividade do antissoro produzido contra a proteína recombinante apenas no extrato proteico da cepa virulenta. Além disso, nesta cepa foi possível detectar também o dímero da proteína nativa. Nos extratos das cepas atenuada e saprófita não foi detectado a proteína nativa. Esses resultados corroboram com os dados *in silico*, uma vez que esta proteína apresenta apenas 33% de identidade na espécie saprofítica em relação à espécie patogênica.

Figura 16 - Detecção da proteína nativa em extratos de *Leptospira* spp. Extratos totais de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Fiocruz L1-130); *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M20) e *L. biflexa* sorovar Patoc (Patoc 1) foram separados por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com antissoro anti-rLIC13259 (1:50), e então, anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000). A reação foi revelada por quimioluminescência.

Após detecção da proteína nativa na cepa patogênica *L. interrogans* sorovar Copenhageni Fiocruz L1-130, foi avaliado a presença da proteína em diferentes espécies e sorovares. Para isso, foram utilizados extratos proteicos das seguintes cepas patogênicas atenuadas: *L. interrogans* sorovar Canicola (Hound Utrech IV); *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae (RGD); *L. interrogans* sorovar Pomona (Pomona) *L. borgpetersenii* sorovar Whitticombi (Whitticombi); *L. kirschneri* sorovar Cynopteri (3522C); *L. kirschneri* Grippytyphosa (Moskva V); *L. santarosai* sorovar Shermani (1342K). A figura 17 mostra que a proteína nativa foi detectada em todas as cepas exceto na cepa patogênica *L. interrogans* sorovar Canicola. A intensidade das bandas das cepas *L. kirschneri* Grippytyphosa e *L. santarosai* sorovar Shermani foram menores quando comparadas com as demais. Os resultados sugerem que a proteína LIC13259 é realmente expressa pela bactéria e conservada em diferentes espécies e sorovares.

Figura 17- Detecção da proteína nativa em extratos de *Leptospira* spp. Extratos totais de leptospiros de diferentes espécies e sorovares foram separados por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com antissoro anti-rLIC13259 (1:50), e então, anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000). A reação foi revelada por quimioluminescência. 1: proteína recombinante LIC13259; 2: *L. interrogans* sorovar Canicola; 3: *L. borgpetersenii* sorovar Whitticombi; 4: *L. kirschineri* sorovar Cynopteri; 5: *L. kirschineri* sorovar Grippotyphosa; 6: *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae; 7: *L. santarosai* sorovar Shermani.

4.11 Ensaio de localização da proteína nativa nas leptospiros intactas

Para avaliação da localização celular da proteína em estudo, culturas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 (atenuada) e *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1 (saprofítica) foram incubadas com antissoro policlonal anti-rLIC13259 por 2 horas. Em seguida, essa interação foi detectada com anti-IgG de camundongo conjugado com FITC. Como controles negativos foram usados soros de animais imunizados com DnaK e somente com PBS. Os resultados demonstrados na figura 18 sugerem a presença da proteína LIC13259 na superfície das células, uma vez que a detecção desta proteína apresentou valores de absorbância superior aos valores encontrados para DnaK. Além disso, estes resultados mostram que a detecção da proteína apresentou valores inferiores para a cepa saprofítica, sugerindo, portanto, que esta proteína seja expressa somente na cepa patogênica.

Figura 18 - Localização da proteína nativa LIC13259 nas leptospiros. *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 e *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1 foram imobilizadas em tubos de ensaio. A detecção da ligação foi feita após incubação com antissoro contra a proteína recombinante (1:50 para rLIC13259 e 1:1000 para anti-rDnaK e anti-PBS), seguida da incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com FITC. Os dados representam o valor da média da excitação em 485 nm e emissão em 538 nm $\pm$ desvio padrão de uma triplicata e são representativos de dois experimentos independentes. Para análise estatística, foi realizada comparação das médias dos grupos por teste t-Student (***p<0,001).

4.12 Análise da localização celular da proteína nativa por imunofluorescência

Outro método utilizado para avaliar a localização da LIC13259 nas leptospiros foi por imunofluorescência. Para isso, as leptospiros foram inicialmente fixadas com paraformaldeído e em seguida, incubadas com o antissoro respectivo a proteína. Após a incubação com o anticorpo, as amostras foram tratadas com anti-IgG de camundongo conjugado a FITC para permitir a visualização das proteínas marcadas no microscópio. Além disso, iodeto de propídio foi usado para marcação do DNA genômico da bactéria com o intuito de mostrar a integridade da mesma. Como controle positivo foi usado o antissoro da proteína LipL46, pelo fato de ser uma proteína expressa na superfície (Matsunaga *et al.*, 2006). Como controle negativo foi usado soro PBS. Neste caso, apenas a fluorescência no vermelho foi detectada, devido à cor do iodeto de propídio. Em relação à proteína do presente estudo, os resultados demonstram que o antissoro gerado contra a proteína rLIC13259 foi capaz de reconhecer a proteína nativa presente na *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 (Figura 19). Quando as imagens são sobrepostas nota-se a co-localização das marcações,

o que sugere fortemente que a proteína codificada pelo gene LIC13259 está localizada na superfície da leptospira. Esses dados corroboram com análises *in silico*, realizado pelo Lipop.

Figura 19 - Ensaio de Imunofluorescência. *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 foram fixadas com paraformaldeído e incubadas com antissoro contra LipL46, LIC13250 e soro não-imune. As bactérias foram então incubadas com iodeto de propídio (IP) e anti-IgG de camundongos conjugado com FITC. As imagens foram captadas em microscópio de imunofluorescência confocal LSM 510 META.

4.13 Ensaio de acessibilidade por Proteinase K (PK)

A avaliação da clivagem proteolítica de proteínas expostas se dá com a incubação da bactéria intacta e viável com a PK, uma serino-protease de amplo espectro. Logo após a exposição, é feito um extrato proteolítico a bactéria, esse extrato é separado em SDS-PAGE e transferido para membrana de nitrocelulose para ser incubado com o antissoro produzido para cada proteína recombinante.

Com base nos resultados obtidos (Figura 20), pode-se observar ampla degradação da proteína LipL46 (controle positivo), com apenas meia hora de incubação com a serino-

protease observou uma diminuição de aproximadamente 80% na intensidade da banda. Para a proteína estudada LIC13259, o resultado sugere que esta é uma proteína exposta na bactéria, uma vez que apresentou degradação após exposição das bactérias à serino-protease. Observa-se que com meia hora de exposição, a intensidade da banda foi reduzida quase 50%. Para o controle negativo, DnaK (dados não mostrados), apesar dessa proteína ser considerada citoplasmática, houve degradação após 2 horas de incubação com a PK, esse resultado pode ser explicado devido a exposição prolongada com a PK, o que pode ter prejudicado a integridade das bactérias. Além disso, estudos já demonstraram que a DnaK possui localização celular primária no citoplasma, mas ela pode estar distribuída em outros compartimentos celulares (Guerreiro *et al.*, 2001; Brassard *et al.*, 2004). Resultados semelhantes já foram obtidos para a proteína DnaK de outros microorganismos como *Streptococcus suis* e *Bifidobacterium* (Brassard *et al.*, 2004; Candela *et al.*, 2010). Essas proteínas são referidas como proteínas moonlighting, pois possuem função conhecida no interior da célula, mas podem estar localizadas na superfície celular desempenhando funções diferentes (Eshghi *et al.*, 2015).

Figura 20 - Western Blotting para avaliação de acessibilidade da PK. Culturas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Fiocruz L1-130) foram colocadas em contato com 40 µg de PK em tampão de proteólise e a reação foi interrompida depois de diferentes tempos, com PMSF. Em seguida, as culturas foram centrifugadas e ressuspensas em PBS/s. As amostras foram separadas por SDS-PAGE e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. A detecção da proteína nativa na bactéria foi feita com antissoro específico para cada amostra, anti-DnaK (proteína citoplasmática), anti-rLIC13259, anti-LipL46 (proteína de superfície), e posteriormente detectado com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. A reatividade foi detectada por quimioluminescência. **Análise por densitometria.** Realizada por quantificação dos pixels no programa GelQuant. A porcentagem de intensidade foi medida em relação à amostra 0h. Os dados representam o valor da média ± desvio padrão de uma triplicata. Para análise estatística, foi realizada comparação das médias dos grupos por teste t-Student (**p<0,01; ***p<0,001).

4.14 Avaliação e caracterização da interação da proteína recombinante com componentes do hospedeiro

Proteínas localizadas na superfície da bactéria apresentam alto potencial em participar das interações patógeno-hospedeiro, uma vez que podem desempenhar várias funções, como de adesinas, alvo para anticorpos e receptores para várias moléculas do hospedeiro (Patti *et al.*, 1994). No caso das leptospiros patogênicas, as interações das proteínas com o hospedeiro são estratégias importantes utilizadas para colonizar, invadir e evadir o sistema imune. Portanto, a proteína recombinante foi avaliada quanto a sua capacidade de interagir com componentes do sistema complemento, matriz extracelular e o plasma do hospedeiro. Além disso, as interações a essas moléculas foram caracterizadas a fim de demonstrar sua importância.

4.15 Adesão da proteína recombinante a componentes da matriz extracelular

A ligação das leptospiros às células do hospedeiro e a componentes da matriz extracelular é necessária para que a bactéria consiga penetrar, disseminar-se e persistir nos tecidos. Desse modo, a proteína rLIC13259 foi avaliada quanto a sua capacidade de aderir a componentes da matriz extracelular. Para isso, laminina, fibronectina celular, elastina, colágeno tipo I, colágeno tipo IV e as proteínas controles BSA e fetuína foram imobilizadas em placas de ELISA e a ligação da proteína recombinante foi ensaiada. A proteína rLIC13259 foi capaz de interagir significativamente apenas com laminina (Figura 21A). Dados da literatura demonstram que várias proteínas de leptospira possuem propriedades de ligação específica a laminina e a outros componentes da ECM. Nosso grupo descreveu a primeira proteína de leptospira que se liga à laminina, chamada de Lsa24 (Barbosa *et al.*, 2006). Posteriormente, muitas outras adesinas de leptospira foram descritas e caracterizadas, como as proteínas LigA e LigB (Choy *et al.*, 2007), Lsa21 (Atzingen *et al.*, 2008), LipL32 (Hoke *et al.*, 2008), Lp95 (Atzingen *et al.*, 2009), LipL53 (Oliveira *et al.*, 2010), Lsa63 (Vieira, De Moraes, *et al.*, 2010), Lsa66 (Oliveira *et al.*, 2011), Lsa33 (Domingos *et al.*, 2012), Lsa30 (Souza *et al.*, 2012), Lsa14, Lsa19 (Figueredo *et al.*, 2017), Lsa46, Lsa77 (Teixeira *et al.*, 2015), Lsa37 (Silva *et al.*, 2016), Lsa44, Lsa45 (Fernandes *et al.*, 2014) entre outras.

Com o objetivo de definir a afinidade da ligação da proteína recombinante à laminina, um ensaio de dose-dependência foi realizado. Para isso, uma concentração fixa do componente foi imobilizada e incubada com concentrações crescentes de rLIC13259. Conforme demonstrado na figura 21B, a proteína se ligou de maneira dose-dependente, mas a saturação não foi atingida. Sendo assim, não foi possível calcular a constante de dissociação.

Figura 21- Ensaio de adesão da proteína recombinante a componentes da matriz extracelular. (A) Laminina, Fibronectina celular, colágeno tipo I e IV, elastina e controles negativos, BSA e fetuína (1μg) foram imobilizados em placas de microdiluição. Então 1 μg por poço da proteína recombinante foi incubada por 2 horas à 37 °C. A detecção da reação foi feita através da incubação com antissoro anti-rLIC13259 (1:5000), seguida de incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:10000). (B) Experimento de dose-resposta da proteína recombinante a laminina. O componente imobilizado foi incubado com concentrações crescentes da proteína recombinante. Os dados representam o valor da média ± desvio -padrão de uma triplicata, e são representativos de três experimentos independentes. Para análise estatística, a ligação da proteína a cada componente foi comparada aos controles negativos, embora o p-valor apresentado neste gráfico se refira à comparação com BSA, pelo teste t-Student (**p<0,01).

4.16 Caracterização da ligação da proteína recombinante à laminina

A laminina é uma proteína heterotrimérica de aproximadamente 800 kDa, uma característica típica da laminina é seu alto teor de carboidratos, normalmente entre 13 e 15% (Fujiwara *et al.*, 1988). Assim, devido às propriedades que o metaperiodato de sódio apresenta em oxidar grupamento hidroxil presentes nos carboidratos, a importância desses resíduos na interação da laminina com a proteína recombinante foi avaliada. Para isso, a laminina foi imobilizada em placa de microdiluição e incubada com concentrações crescentes de metaperiodato de sódio. Em seguida, a proteína rLIC13259 foi adicionada para verificar o perfil de ligação. É importante ressaltar que a concentração de metaperiodato de sódio usada é suficiente apenas para oxidar os carboidratos presentes na superfície da laminina, sendo assim, a estrutura peptídica da molécula não é comprometida (Woodward *et al.*, 1985). Os resultados encontrados na figura 22 revelam que a oxidação dos resíduos de carboidrato da laminina não interferiu na ligação. Pelo contrário, pode-se inferir que o tratamento com o agente oxidante pode alterar a estrutura da laminina e expor sítios de ligação à rLIC13259, aumentando a ligação da recombinante ao componente. Nossos resultados foram semelhantes aos resultados obtidos por (Fernandes *et al.*, 2014) com a proteína rLIC10731, mas diferem de dados encontrados para a maioria de outros ligantes de laminina, como Lsa24 (Barbosa *et al.*,

2006) Lsa25 (Domingos *et al.*, 2012), Lsa19 (Figueredo *et al.*, 2017). Estes dados indicam que as adesinas podem interagir com a laminina em diferentes regiões.

Figura 22 - Efeito do metaperiodato de sódio na interação da proteína recombinante a laminina. Laminina (1µg/poço) foi incubada em concentrações crescentes de metaperiodato de sódio, para oxidação dos resíduos de açúcar. Em seguida, foi adicionado a proteína recombinante e a interação prosseguiu por 2 horas. A detecção foi realizada pela incubação com antissoro contra proteína recombinante. Para análise estatística, os valores de absorbância foram comparados com a situação na qual a laminina não foi incubada com metaperiodato de sódio pelo teste t- Student (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

4.17 Efeito da proteína desnaturada na ligação à laminina

Com o intuito de avaliar a importância da estrutura proteica na interação com a laminina, a proteína foi submetida a altas temperaturas para promover sua desnaturação, e em seguida, sua interação foi avaliada aos componentes por ELISA. Como controle negativo foi usada a proteína BSA. Os resultados (Figura 23) mostram um aumento significativo na interação desta proteína com a laminina. Estes dados sugerem que os domínios envolvidos na interação são preferencialmente lineares, ou seja, independente da conformação da proteína. Resultados semelhantes foram observados para a interação da proteína Lsa36 ao plasminogênio (Siqueira *et al.*, 2013).

Figura 23 - Efeito da desnaturação termina da proteína recombinante na interação à laminina. A proteína recombinante foi incubada a 100 °C por 10 minutos e então adicionada à placa de ELISA para interação com a laminina previamente imobilizada. A detecção foi realizada pela incubação com antissoro contra proteína recombinante. Para análise estatística, as médias foram comparadas com a situação na qual a proteína não foi desnaturada pelo teste t- *Student* (** $p < 0,001$).

4.18 Interação da proteína recombinante a componentes do plasma humano

A capacidade de interação das leptospiros com diferentes componentes do plasma é crucial para o estabelecimento da infecção. Assim sendo, já foi demonstrado que as leptospiros patogênicas apresentam a capacidade de interagir com diferentes moléculas do hospedeiro, como plasminogênio (Vieira *et al.*, 2009), fibrinogênio (Choy *et al.*, 2007) e fibronectina e conseguem superar as barreiras do hospedeiro e promover a infecção (Merien *et al.*, 2000; Meri *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2013).

Como algumas proteínas presentes na superfície das leptospiros têm sido identificadas como os receptores responsáveis por mediar essa interação, foi analisado se a proteína do presente estudo é capaz de atuar como receptora de algum desses componentes do hospedeiro. Desse modo, a interação da proteína rLIC13259 foi avaliada, por ELISA, com os seguintes componentes: PLG, fibronectina plasmática e fibrinogênio. Os resultados obtidos mostram que a proteína recombinante foi capaz de interagir significativamente ao plasminogênio (Figura 24A). Para confirmar se de fato a ligação desse componente à proteína recombinante ocorre de forma específica, proteína recombinante foi imobilizada em placa de microdiluição e incubada com plasminogênio. A interação foi detectada após uso de um

anticorpo anti-plasminogênio (Figura 24B). Além disso, essa interação foi avaliada por *immunoblotting*. Onde o plasminogênio, um zimógeno com 92 kDa, foi separado em SDS-PAGE e eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com proteína recombinante. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo policlonal anti-rLIC13259, e em seguida, um anticorpo anti-IgG de camundongos conjugado com peroxidase foi adicionado. Os resultados reforçam a consistência observada na interação da proteína ao plasminogênio (Figura 24C). Por fim, foi verificada a especificidade da ligação da proteína recombinante ao plasminogênio em um ensaio de dose-dependência. Para isso, uma concentração fixa do componente foi imobilizada e incubada com concentrações crescentes de rLIC13259. Os resultados mostram que a proteína se ligou de maneira dose-dependente ao plasminogênio, mas a saturação não foi atingida. Sendo assim, não foi possível calcular a constante de dissociação (Figura 24D).

Na literatura tem sido mostrado que esse mecanismo de interação com PLG contribui significativamente para a virulência de muitos patógenos, uma vez que esses organismos apresentam capacidade de capturar o PLG do hospedeiro, convertê-lo em sua forma ativa e por fim degradar componentes importantes que facilita o processo de invasão (Fuchs *et al.*, 1994; Bergmann *et al.*, 2013).

Figura 24 - Análise da interação da proteína recombinante a componentes do plasma. (A) Plasminogênio, fibronectina plasmática, fibrinogênio e controles negativos, BSA e fetuína (1μg) foram imobilizados em placas de microdiluição. Então 1 μg por poço da proteína recombinante foi incubada por 2 horas à 37 °C. A detecção da reação foi feita através da incubação com antissoro anti-rLIC13259 (1:5000), seguida de incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:10000). (B) Proteína recombinante foi imobilizada em placa de ELISA, em seguida, foi incubada com plasmingênio. A detecção da reação foi feita através da incubação com antissoro anti-plasminogênio (1:3000), seguida de incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:10000). (C) Ensaio de interação por imunoblotting. O PLG foi separado por SDS-PAGE e eletrotransferido para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com a proteína recombinante e, em seguida, incubada com antissoro anti-rLIC13259. (D) Experimento de dose-resposta da proteína recombinante ao PLG. O componente imobilizado foi incubado com concentrações crescentes da proteína recombinante. Os dados representam o valor da média ± desvio-padrão de uma triplicata, e são representativos de três experimentos independentes. Para análise estatística, a ligação da proteína a cada componente foi comparada aos controles negativos, embora o p-valor apresentado neste gráfico se refira à comparação com BSA, pelo teste t-Student (**p<0,01).

4.19 Efeito da proteína desnaturada na ligação ao plasminogênio

Novamente, com o objetivo de avaliar a importância da estrutura da proteína na interação ao plasminogênio, a proteína LIC13259 foi submetido ao processo de desnaturação em altas temperaturas. Em seguida, a interação da proteína ao componente foi avaliada por ELISA. Os resultados obtidos demonstram redução significativa na interação ao

plasminogênio, isso sugere que a estrutura da proteína é importante para suas propriedades de interação, ou seja, os domínios de ligação são preferencialmente conformacionais. No entanto, como a desnaturação não inibiu totalmente a interação, pode-se inferir que epítomos lineares também participam dessa interação (Figura 25). Resultados semelhantes foram observados para vários ligantes de plasminogênio, como Lsa77 (Teixeira *et al.*, 2015), OmpL1 (Fernandes *et al.*, 2012), Lsa19 e Lsa14 (Figueredo *et al.*, 2017), entre outras.

Figura 25 - Efeito da proteína desnaturada na ligação ao plasminogênio. A proteína recombinante foi incubada a 100 °C por 10 minutos e então adicionada à placa de ELISA para interação com o plasminogênio previamente imobilizado. A detecção foi realizada pela incubação com antissoro contra proteína recombinante. Para análise estatística, as médias foram comparadas com a situação na qual a proteína não foi desnaturada pelo teste t- Student (**p<0,01).

4.20 Efeito do ACA na interação da proteína ao PLG

O plasminogênio é um zimógeno que é convertido à sua forma ativa por ativadores proteolíticos. A cadeia pesada dessa molécula contém cinco domínios estruturais conhecidos como *Kringles*. Já é bem estabelecido na literatura que estes domínios medeiam a interação de alguns patógenos com plasminogênio via resíduos de lisina de proteínas presentes na superfície dos patógenos (Lähteenmäki *et al.*, 2001). O mesmo padrão de ligação foi observado em leptospiros patogênicos (Vieira *et al.*, 2009). Sendo assim, foi avaliado se a ligação da proteína estudada ao plasminogênio ocorre via resíduos de lisina. Para isso, um ensaio de ELISA foi realizado na presença de ácido aminocaprílico (ACA), um análogo de lisina, para competir com a ligação da proteína recombinante. De acordo com os resultados

demonstrados no gráfico da figura 26, sugere-se que a interação da rLIC13259 ao plasminogênio ocorre pela ligação dos domínios *Kringle* aos resíduos de lisina presentes na proteína, uma vez que essa interação foi reduzida significativamente quando na presença do competidor ACA. Nossos resultados corroboram com os experimentos realizados pelo grupo que demonstram a participação desses domínios na ligação de diferentes proteínas de *L. interrogans* (Vieira, Atzingen, *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2012; Domingos *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2015; Figueredo *et al.*, 2017).

Figura 26 - Influência dos resíduos de lisina na ligação da proteína recombinante ao plasminogênio. Plasminogênio (1 µg/poço) foi imobilizado, e então foi adicionado a proteína recombinante, co-incubadas com ácido aminocaprílico (2 e 20 mM). Após interação, a detecção da ligação da proteína ao plasminogênio foi feita por meio de antissoro anti-rLIC13259, seguida de incubação com anti-IgG de camundongos conjugado com peroxidase. Para análise estatística, as médias foram comparadas com a situação na qual a proteína não foi incubada com o competidor pelo teste t- Student (**p<0,01).

4.21 Conversão do plasminogênio à plasmina na presença da proteína recombinante

Dados na literatura demonstram que a leptospira é capaz de capturar o plasminogênio presente no plasma do hospedeiro, utilizando receptores e transformá-lo em sua forma ativa, a plasmina, utilizando ativadores do próprio hospedeiro (Vieira *et al.*, 2009). A plasmina é uma serino-protease de amplo espectro capaz de degradar diversos componentes da matriz extracelular, imunoglobulinas e componentes do sistema complemento. Tal capacidade é crucial para a que a bactéria seja capaz de invadir e evadir o sistema imune do hospedeiro, conseguindo, portanto, colonizar diferentes órgãos e estabelecer a infecção (Vieira e Nascimento, 2015). Desse modo, para verificar se o plasminogênio ligado a proteína rLIC13259 é passível de ser convertido em plasmina, a proteína recombinante LIC13259 foi

imobilizada em placa de ELISA, e então incubada com plasminogênio. Em seguida, o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) foi adicionado juntamente com o substrato cromogênico específico para a plasmina. A ativação da plasmina foi medida indiretamente pela clivagem do substrato a 405 nm. Os resultados obtidos demonstram que o plasminogênio ligado a rLIC13259 pode ser convertido em plasmina. BSA e fetuína, proteínas que não se ligam a plasminogênio, foram utilizadas como controles negativos da reação, e, portanto, não apresentaram nenhuma atividade proteolítica. Além disso, nenhuma clivagem foi observada também para os controles onde algum dos componentes foi omitido da reação (Figura 27). A capacidade de plasmina ser gerada na superfície da bactéria é uma estratégia interessante, pois permite a degradação de componentes do hospedeiro, o que facilita os processos de invasão e disseminação do patógeno (Vieira e Nascimento, 2015). Portanto, os dados sugerem que a proteína rLIC13259 pode estar envolvida na patogênese das leptospiros.

Figura 27 - Análise da ativação do plasminogênio em plasmina. A ativação do plasminogênio em plasmina foi avaliada indiretamente por ELISA. A proteína imobilizada foi tratada com: PLG + uPA + Substrato específico, ou controle nos quais um dos componentes foi omitido. BSA e fetuína foram empregados como controle negativo. As barras representam o valor médio de absorbância no comprimento de onda de 405 nm, como uma medida da clivagem do substrato, $\pm$ o desvio de padrão de triplicatas e são representativas de três experimentos independentes. A significância estatística é dada em relação ao BSA por teste *t-Student* (** $p < 0,01$).

4.22 Recrutamento do plasminogênio a partir do soro humano

Conforme já descrito, leptospiros virulentas são capazes de capturar o plasminogênio presente no plasma humano (Vieira *et al.*, 2009). Sendo assim, foi avaliada a

capacidade da proteína recombinante interagir com o plasminogênio circulante no soro humano normal por ensaio de ELISA. A proteína recombinante foi imobilizada em placas de microdiluição e incubada com diferentes concentrações de soro humano normal. A interação foi detectada usando anticorpo específico anti-PLG e anti-camundongo conjugado com peroxidase. Conforme apresentado na figura 28, a proteína rLIC13259 foi capaz de capturar o plasminogênio circulante no soro de maneira dose-dependente, mas não atingiu a saturação nas concentrações testadas. Foi usado gelatina como controle negativo. O perfil de interação da proteína recombinante ao plasminogênio no soro humano comercial foi semelhante ao perfil de ligação da rLIC13259 ao componente purificado. Outras proteínas de *Leptospira* já foram caracterizadas quanto a sua capacidade de recrutar o PLG direto do soro humano, tais como Lsa23(Siqueira, Atzingen, *et al.*, 2016b), Lsa25.6 e Lsa16 (Pereira *et al.*, 2017). Esses dados mostram a relevância dessa interação, visto que se aproxima do que ocorre *in vivo*. Sugere, portanto, a participação da proteína LIC13259 na colonização e infecção bacteriana.

Figura 28 - Avaliação do recrutamento do plasminogênio a partir do soro humano. 2,5 µg de proteína recombinante foram imobilizados em placas de ELISA e incubados com diferentes concentrações de soro humano comercial (*Complement Technology*). Gelatina foi usada como controle negativo de ligação. A ligação foi detectada com antissoro policlonal anti-plasminogênio. Cada ponto representa a média de absorbância de uma triplicata a 492 nm $\pm$ desvio padrão, e é representativo de dois experimentos independentes.

4.23 Interação da proteína recombinante a componentes do sistema complemento

O sistema complemento é composto por mais de 50 proteínas e receptores do plasma. É considerado uma das primeiras linhas de defesa contra microrganismos. Já foi demonstrado que espécies patogênicas de *leptospira* conseguem resistir e sobreviver às

proteínas do soro humano. Por outro lado, as espécies saprófitas são susceptíveis à essas proteínas (Meri *et al.*, 2005). Assim, acredita-se que as espécies patogênicas consigam driblar o sistema imune do hospedeiro, por meio de diferentes estratégias com objetivo de estabelecer a infecção. Na literatura, já foram identificadas diversas proteínas de leptospira que são capazes de interagir com moléculas do sistema complemento, como LcpA (Da Silva *et al.*, 2015), Lsa23 (Siqueira, Atzingen, *et al.*, 2016a). Neste sentido, a capacidade da proteína rLIC13259 em interagir com algumas proteínas do sistema complemento, como C6, C7, C8, C9, vitronectina, fator H e C4BP foi avaliado. Os resultados obtidos mostram que a proteína recombinante foi capaz de interagir significativamente com C6, C7, C8, C9 e vitronectina (Figura 29A).

Para certificar se de fato a interação da proteína aos componentes ocorre de forma específica, a proteína recombinante foi imobilizada em placas de microdiluição e incubadas com C6, C7, C8, C9 e vitronectina. Em seguida foi utilizado anticorpo específico para cada componente. Os resultados obtidos confirmaram a interação da proteína aos componentes (Figura 29B). No entanto, nenhuma interação foi observada com C6. Essa interação também foi avaliada por *immunoblotting*. Onde C7 (92 kDa), C8 (66 kDa), C9 (71 kDa) e vitronectina (75 kDa) foram separados em SDS-PAGE e eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose, as quais foram incubadas com proteína recombinante. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-rLIC13259 e em seguida, anticorpo anti-IgG de camundongos conjugado com peroxidase. Os resultados reforçam a interação da proteína aos componentes testados (Figura 29C).

Figura 29 - Análise da interação da proteína recombinante a componentes do sistema complemento. (A) C6, C7, C8, C9, fator H, vitronectina, C4BP e controle negativo BSA (1µg) foram imobilizados em placas de microdiluição. Então 2,5 µg por poço da proteína recombinante foi incubada por 2 horas à 37 °C. A detecção da reação foi feita através da incubação com antissoro anti-rLIC13259 (1:5000), seguida de incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:10000). (B) Proteína recombinante foi imobilizada em placa de ELISA, em seguida, foi incubada com C7, C8, C9 e vitronectina. A detecção da reação foi feita através da incubação com antissoro específico para cada componente, seguida de incubação com anticorpo anti-IgG específico conjugado com peroxidase. (C) Ensaio de interação por imunoblotting. Os componentes C7, C8, C9 e vitronectina foram separados por SDS-PAGE e eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com a proteína recombinante e, em seguida, incubado com antissoro contra rLIC13259. Para análise estatística, a ligação da proteína a cada componente foi comparada ao BSA pelo teste t-Student (**p<0,01 e ***p<0,001).

Para definir a afinidade da ligação da proteína recombinante aos componentes testados, um ensaio de dose-dependência foi realizado. Para isso, uma concentração fixa do componente foi imobilizada e incubada com concentrações crescentes de rLIC13259. Ligação dose-dependente foi observado para todos os componentes, mas a saturação foi atingida apenas para C8, aproximadamente em 7 µM de proteína (Figura 30). Assim, a constante de dissociação (K_D) pôde ser calculada e mostrou K_D de $656 \pm 141,4$ nm.

Figura 30 - Curva de dose-resposta da interação da proteína recombinante aos componentes. Experimento de dose-resposta da proteína recombinante a (A) C7, (B) C8, (C) C9 e (D) vitronectina. O componente imobilizado foi incubado com concentrações crescentes da proteína recombinante. Os dados representam o valor da média $\pm$ desvio-padrão de uma triplicata, e são representativos de dois experimentos independentes.

4.24 Efeito da proteína desnaturada na ligação aos componentes do sistema complemento

Para avaliarmos a importância da estrutura da proteína na interação aos componentes do sistema complemento, a proteína LIC13259 foi submetida ao processo de desnaturação em altas temperaturas. Em seguida, a interação da proteína aos componentes foi avaliada por ELISA. Os resultados obtidos demonstram que para todos os componentes testados houve aumento significativo na interação à proteína. No entanto, este aumento foi mais expressivo na interação da proteína ao C9 e C8, e menos expressivo ao C7 e à vitronectina (Figura 31). Estes dados sugerem que os domínios envolvidos na interação são preferencialmente lineares e que os domínios conformacionais não são tão importantes para a interação. Resultados semelhantes a estes foram observados para a interação da proteína Lsa36 ao plasminogênio (Siqueira *et al.*, 2013).

Figura 31 - Efeito da proteína desnaturada na ligação aos componentes do sistema complemento. A proteína recombinante foi incubada a 100 °C por 10 minutos e então adicionada à placa de ELISA para interação com (A) C7, (B) C8, (C) C9 e (D) vitronectina previamente imobilizados. A detecção foi realizada pela incubação com antissoro contra proteína recombinante. Para análise estatística, as médias foram comparadas com a situação na qual a proteína não foi desnaturada, pelo teste t- Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

4.25 Caracterização da interação da proteína recombinante aos componentes do sistema complemento

Foi verificado se a interação da proteína recombinante aos componentes ocorre via domínios de heparina, uma vez que os componentes testados apresentam domínios de ligação a heparina em sua estrutura. Para isso, cada componente foi imobilizado em placas de ELISA e incubados com concentrações crescentes de heparina (0-500 $\mu\text{g/mL}$). Em seguida, incubou-se a proteína rLIC13259 para avaliar interação aos componentes na presença do competidor. Conforme os resultados apresentados na figura 33, a interação com todos os componentes foi diminuída na presença do competidor. No entanto, para C7, C8 e C9 essa diminuição foi significativa apenas em altas concentrações de heparina. Para C7, uma concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ de heparina foi necessária para reduzir em quase 50% essa ligação (Figura 32A). Ao passo que para C8 e C9 foram necessários 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e 125 $\mu\text{g/mL}$ de heparina, respectivamente, para reduzir quase 30% (Figura 32B e C). Dados sugerem que a interação da proteína recombinante aos componentes pode ocorrer via domínios de ligação a heparina, no entanto, esta interação não ocorre exclusivamente nesta região. Dados semelhantes foram observados na interação da proteína PGK de *Streptococcus*

pneumoniae aos componentes, C7, C8 e C9 que a heparina reduziu aproximadamente 50% da ligação (Blom *et al.*, 2014), o mesmo ocorreu para a proteína CspA de *Borrelia burgdorferi* onde a heparina inibiu até 40% da interação da proteína ao componente C9 (Hallström *et al.*, 2013). No caso de vitronectina ocorreu diminuição significativa e bem expressiva na presença de 15 µg/mL de heparina, uma vez que baixa concentração do competidor reduziu a interação em aproximadamente 80% (Figura 32D). Isso sugere que a proteína recombinante interage via domínios de heparina presentes na molécula de vitronectina, semelhante ao observado para LcpA (Da Silva *et al.*, 2015).

Figura 32 - Influência dos domínios de heparina na ligação da proteína recombinante aos componentes do sistema complemento. (A) C7, (B) C8, (C) C9 e (D) vitronectina (1 µg/poço) foram imobilizados em placa de ELISA, e então foi adicionado a proteína recombinante, co-incubadas com concentrações crescentes de heparina (0 – 500 µg/mL). Após interação, a detecção da ligação da proteína aos componentes foi feita por meio de antissoro anti-rLIC13259, seguida de incubação com anti-IgG de camundongos conjugado com peroxidase. Para análise estatística, as médias foram comparadas com a situação na qual a proteína não foi incubada com o competidor pelo teste t-Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,001$).**

4.26 Recrutamento de C7, C8, C9 e vitronectina a partir do soro humano

Uma vez que C7, C8, C9 e vitronectina estão presentes no soro humano, foi avaliada a capacidade da proteína recombinante interagir com estes componentes circulantes no soro humano comercial por ensaio de ELISA. A proteína recombinante foi imobilizada em

placas de microdiluição e incubada com diferentes concentrações de soro humano comercial. A interação foi detectada usando anticorpo específico para cada componente. Gelatina foi usada como controle negativo. Conforme apresentado na figura 33, a proteína rLIC13259 foi capaz de capturar, a partir do soro humano, todos os componentes de maneira dose-dependente. Novamente, a saturação foi atingida para C8. Assim o perfil de interação da proteína recombinante aos componentes C7, C8 e C9 no soro humano comercial foi semelhante ao perfil de ligação da rLIC13259 ao componente purificado. No caso de vitronectina (Figura 33D), o perfil se diferenciou quando comparado as duas condições de interação, visto que neste ensaio a saturação foi obtida. De qualquer modo, esse experimento mostra a importância dessa interação por se aproximar do que ocorre *in vivo*.

Figura 33 - Recrutamento de C7, C8, C9 e vitronectina a partir do soro humano. 2,5 µg de proteína recombinante foram imobilizadas em placas de ELISA e incubadas com diferentes concentrações de soro humano comercial (Complement Technology). Gelatina foi usada como controle negativo de ligação. A ligação foi detectada com antissoro policlonal específico para cada componente (A) C7, (B) C8, (C) C9, (D) vitronectina. Cada ponto representa a média de absorbância de uma triplicata a 492 nm $\pm$ desvio padrão, e é representativo de dois experimentos independentes.

4.27 Ensaio de polimerização de C9

Uma vez que rLIC13259 se liga a C9 de forma dose-dependente, foi verificado se a proteína em estudo poderia interferir na polimerização de C9. Para isso, rLIC13259 foi primeiramente incubado com C9, e a polimerização foi então induzida por ZnCl₂. Com base

nos resultados obtidos (Figura 34), pode-se observar que na presença de 2,5 μg da proteína a polimerização foi diminuída (linha 3), e 5 μg de proteína inibiu quase que completamente a polimerização de C9 (linha 4). BSA não interferiu na polimerização (linha 5). Resultados semelhantes já foram obtidos para a proteína LcpA, a qual inibiu completamente a polimerização de C9 (Da Silva *et al.*, 2015). Além disso, proteínas de *Borrelia* spp, CspA, (Hallström *et al.*, 2013), BGA66, BGA71 (Hammerschmidt *et al.*, 2016) e a proteína de *Streptococcus pneumoniae* PGK (Blom *et al.*, 2014) também interferiram na polimerização de C9. Esses dados sugerem que a LIC13259 por se ligar a C9 e, conseqüentemente, inibir a formação do complexo de ataque à membrana pode contribuir para a colonização bem sucedida da *Leptospira* patogênica, além de favorecer a evasão sistema imune do hospedeiro, facilitando o estabelecimento da infecção.

Figura 34- Ensaio de polimerização de C9. C9 foi incubado com rLIC13259 (1,25 a 5 μg) ou BSA (2,5 μg) durante 40 minutos antes da adição de ZnCl_2 durante 2 horas a 37 °C. As amostras foram separadas por SDS-PAGE em um gel de gradiente (4 a 20%) e a polimerização de C9 foi visualizada por coloração de azul de comassie. M: padrão de massa molecular; 1: C9 + ZnCl_2 ; 2: C9 + 1,25 μg rLIC13259 + ZnCl_2 ; 3: C9 + 2,5 μg rLIC13259 + ZnCl_2 ; 4: C9 + 5 μg rLIC13259 + ZnCl_2 ; 5: C9 + BSA + ZnCl_2 ; 6: C9.

5. CONCLUSÃO

É possível concluir que LIC13259 identificada no genoma de *L. interrogans* pode auxiliar as leptospiros patogênicas no processo de colonização, invasão e evasão imune do hospedeiro, uma vez que essa proteína foi capaz de aderir a laminina, interagir com plasminogênio e torná-lo enzimaticamente ativo, além de interagir com os componentes da via terminal do complemento. Assim, é possível que LIC13259 contribua para os mecanismos de patogenicidade, especialmente no processo de evasão imune das leptospiros patogênicas.

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. K.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª ed. 2015.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol**, v. 140, n. 3-4, p. 287-96, Jan 2010. ISSN 1873-2542. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345023> >.

AHMED, N. et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 5, p. 28, 2006. ISSN 1476-0711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17121682> >.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 17, p. 3389-402, Sep 1997. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254694> >.

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. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18445272> >.

_____. Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with Leptospira interrogans. **J Med Microbiol**, v. 59, n. Pt 9, p. 1005-15, Sep 2010. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20558583> >.

_____. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. **J Infect**, v. 59, n. 4, p. 264-76, Oct 2009. ISSN 1532-2742. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665803> >.

_____. Evaluation of immunoprotective activity of six leptospiral proteins in the hamster model of leptospirosis. **Open Microbiol J**, v. 6, p. 79-87, 2012. ISSN 1874-2858. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23173023> >.

BARBOSA, A. S. et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infect Immun**, v. 74, n. 11, p. 6356-64, Nov 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16954400> >.

_____. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infect Immun**, v. 77, n. 3, p. 1137-43, Mar 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114549> >.

_____. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of Leptospira spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infect Immun**, v. 78, n. 7, p. 3207-16, Jul 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404075> >.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011

BERGMANN, S.; SCHOENEN, H.; HAMMERSCHMIDT, S. The interaction between bacterial enolase and plasminogen promotes adherence of *Streptococcus pneumoniae* to epithelial and endothelial cells. **Int J Med Microbiol**, v. 303, n. 8, p. 452-62, Dec 2013. ISSN 1618-0607. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23906818> >.

BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 12, p. 757-71, Dec 2003. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14652202> >.

BLOM, A. M. et al. *Streptococcus pneumoniae* phosphoglycerate kinase is a novel complement inhibitor affecting the membrane attack complex formation. **J Biol Chem**, v. 289, n. 47, p. 32499-511, Nov 2014. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25281746> >.

BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis on type hardjo-bovis infection of cattle. **Am J Vet Res**, v. 50, n. 12, p. 2004-8, Dec 1989. ISSN 0002-9645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2610425> >.

BRASSARD, J.; GOTTSCHALK, M.; QUESSY, S. Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. **Vet Microbiol**, v. 102, n. 1-2, p. 87-94, Aug 2004. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15288930> >.

CANDELA, M. et al. DnaK from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* is a surface-exposed human plasminogen receptor upregulated in response to bile salts. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 6, p. 1609-18, Jun 2010. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20167618> >.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M. et al. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **J Infect Dis**, v. 205, n. 6, p. 995-1004, Mar 2012. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22291192> >.

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 5, p. 760-8, Sep 2009. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19540362> >.

CHASSIN, C. et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. **J Immunol**, v. 183, n. 4, p. 2669-77, Aug 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635914> >.

CHOY, H. A. et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infect Immun**, v. 75, n. 5, p. 2441-50, May 2007. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17296754> >.

CINCO, M. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. **New Microbiol**, v. 33, n. 4, p. 283-92, Oct 2010. ISSN 1121-7138. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21213586> >.

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 9, p. e0003898, Sep 2015. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26379143> >.

DA SILVA, L. B. et al. Pathogenic *Leptospira* Species Acquire Factor H and Vitronectin via the Surface Protein LcpA. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 3, p. 888-897, Mar 2015. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000351230200004 >.

DAVANLOO, P. et al. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 7, p. 2035-9, Apr 1984. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6371808> >.

DOMINGOS, R. F. et al. Novel *Leptospira interrogans* protein Lsa32 is expressed during infection and binds laminin and plasminogen. **Microbiology**, v. 161, n. Pt 4, p. 851-64, Apr 2015. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25627443> >.

_____. Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions. **BMC Microbiol**, v. 12, p. 50, 2012. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22463075> >.

ESHGHI, A. et al. Pathogenic *Leptospira interrogans* exoproteins are primarily involved in heterotrophic processes. **Infect Immun**, v. 83, n. 8, p. 3061-73, Aug 2015. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25987703> >.

EVANGELISTA, K. V. et al. Immunoprotective properties of recombinant LigA and LigB in a hamster model of acute leptospirosis. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0180004, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28704385> >.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 2. 1999.

FELDMAN, C.; ANDERSON, R. Review: current and new generation pneumococcal vaccines. **J Infect**, v. 69, n. 4, p. 309-25, Oct 2014. ISSN 1532-2742. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24968238> >.

FERNANDES, L. G. et al. *Leptospira* spp.: Novel insights into host-pathogen interactions. **Vet Immunol Immunopathol**, Dec 2015. ISSN 1873-2534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26727033> >.

_____. Immune response and protective profile elicited by a multi-epitope chimeric protein derived from *Leptospira interrogans*. **Int J Infect Dis**, v. 57, p. 61-69, Apr 2017. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28161462> >.

_____. Functional and immunological evaluation of two novel proteins of *Leptospira* spp. **Microbiology**, v. 160, n. Pt 1, p. 149-64, Jan 2014. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24162609> >.

_____. OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. **Infect Immun**, v. 80, n. 10, p. 3679-92, Oct 2012. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22802342> >.

FIGUEREDO, J. M. et al. Characterization of two new putative adhesins of *Leptospira interrogans*. **Microbiology**, v. 163, n. 1, p. 37-51, Jan 2017. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28198346> >.

FOUTS, D. E. et al. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?:Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 2, p. e0004403, Feb 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26890609> >.

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. 876-86, Mar 2014. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24163418> >.

FRAGA, T. R.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S. Complement Evasion by Pathogenic. **Front Immunol**, v. 7, p. 623, 2016. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28066433> >.

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. 12594-8, Dec 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7809084> >.

FUJIWARA, S. et al. Structure and distribution of N-linked oligosaccharide chains on various domains of mouse tumour laminin. **Biochem J**, v. 252, n. 2, p. 453-61, Jun 1988. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2458101> >.

GAMBERINI, M. et al. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiol Lett**, v. 244, n. 2, p. 305-13, Mar 2005. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15766783> >.

GOUVEIA, E. L. et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 3, p. 505-8, Mar 2008. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18325275> >.

GUERRA, M. A. Leptospirosis: public health perspectives. **Biologicals**, v. 41, n. 5, p. 295-7, Sep 2013. ISSN 1095-8320. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23850378> >.

GUERREIRO, H. et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infect Immun**, v. 69, n. 8, p. 4958-68, Aug 2001. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11447174> >.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Leptospira: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Mol Microbiol**, v. 77, n. 4, p. 805-14, Aug 2010. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20598085> >.

HAAKE, D. A. et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infect Immun**, v. 67, n. 12, p. 6572-82, Dec 1999. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10569777> >.

HAAKE, D. A.; ZÜCKERT, W. R. The leptospiral outer membrane. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 387, p. 187-221, 2015. ISSN 0070-217X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25388136> >.

HALLSTRÖM, T. et al. CspA from *Borrelia burgdorferi* inhibits the terminal complement pathway. **MBio**, v. 4, n. 4, Aug 2013. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23943762> >.

HAMMERSCHMIDT, C. et al. BGA66 and BGA71 facilitate complement resistance of *Borrelia bavariensis* by inhibiting assembly of the membrane attack complex. **Mol Microbiol**, v. 99, n. 2, p. 407-24, Jan 2016. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26434356> >.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J Mol Biol**, v. 166, n. 4, p. 557-80, Jun 1983. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345791> >.

HOKE, D. E. et al. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudomonas tunicata*. **Infect Immun**, v. 76, n. 5, p. 2063-9, May 2008. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18285490> >.

IKOEV, V. N. et al. [The evaluation of the reactogenicity and immunogenic activity of a new concentrated inactivated leptospirosis vaccine]. **Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol**, n. 4, p. 39-43, 1999 Jul-Aug 1999. ISSN 0372-9311. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10852048> >.

JOHNSON, R. C.; MUSCHEL, L. H. ANTILEPTOSPIRAL ACTIVITY OF NORMAL SERUM. **J Bacteriol**, v. 89, p. 1625-6, Jun 1965. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14291607> >.

_____. Antileptospiral activity of serum. I. Normal and immune serum. **J Bacteriol**, v. 91, n. 4, p. 1403-9, Apr 1966. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5929774> >.

JUNCKER, A. S. et al. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. **Protein Sci**, v. 12, n. 8, p. 1652-62, Aug 2003. ISSN 0961-8368. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12876315> >.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 10, p. 736-47, Oct 2009. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19756012> >.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 2, p. 296-326, Apr 2001. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11292640> >.

LIN, Y. P. et al. A novel fibronectin type III module binding motif identified on C-terminus of Leptospira immunoglobulin-like protein, LigB. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 389, n. 1, p. 57-62, Nov 2009. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19699715> >.

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. 233-9, Dec 2007. ISSN 0300-8584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429690> >.

LJUNGH, A.; MORAN, A. P.; WADSTRÖM, T. Interactions of bacterial adhesins with extracellular matrix and plasma proteins: pathogenic implications and therapeutic possibilities. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 16, n. 2, p. 117-26, Dec 1996. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8988392> >.

LÄHTEENMÄKI, K.; KUUSELA, P.; KORHONEN, T. K. Bacterial plasminogen activators and receptors. **FEMS Microbiol Rev**, v. 25, n. 5, p. 531-52, Dec 2001. ISSN 0168-6445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742690> >.

MACIEL, E. A. et al. Household transmission of leptospira infection in urban slum communities. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 1, p. e154, Jan 2008. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18357340> >.

MALMSTRÖM, J. et al. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen Leptospira interrogans. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 762-5, Aug 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19606093> >.

MAROTTO, P. C. et al. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. **Clin Infect Dis**, v. 29, n. 6, p. 1561-3, Dec 1999. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10585813> >.

MARTÍNEZ, R. et al. [Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba]. **Rev Panam Salud Publica**, v. 15, n. 4, p. 249-55, Apr 2004. ISSN 1020-4989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15193180> >.

MATSUNAGA, J. et al. LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. **Microbiology**, v. 152, n. Pt 12, p. 3777-86, Dec 2006. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17159228> >.

MCBRIDE, A. J. et al. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 18, n. 5, p. 376-86, Oct 2005. ISSN 0951-7375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148523> >.

MERI, T. et al. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. **Microb Pathog**, v. 39, n. 4, p. 139-47, Oct 2005. ISSN 0882-4010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169184> >.

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, Apr 2000. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10731601> >.

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. 289-98, Jul 1996. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757792> >.

NAHORI, M. A. et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. **J Immunol**, v. 175, n. 9, p. 6022-31, Nov 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16237097> >.

NASCIMENTO, A. L. et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J Bacteriol**, v. 186, n. 7, p. 2164-72, Apr 2004. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15028702> >.

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. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21755014> >.

_____. 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. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009788> >.

OLIVEIRA, T. R. et al. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. **Microbes Infect**, v. 12, n. 3, p. 207-17, Mar 2010. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20026283> >.

PATTI, J. M. et al. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annu Rev Microbiol**, v. 48, p. 585-617, 1994. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7826020> >.

PEREIRA, P. R. M. et al. Multifunctional and Redundant Roles of *Leptospira interrogans* Proteins in Bacterial-Adhesion and fibrin clotting inhibition. **Int J Med Microbiol**, v. 307, n. 6, p. 297-310, Sep 2017. ISSN 1618-0607. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28600123> >.

PIZZA, M. et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1816-20, Mar 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10710308> >.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes Infect**, v. 2, n. 10, p. 1265-76, Aug 2000. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11008116> >.

RAMOS, C. R. et al. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 8, p. 1103-9, Aug 2004. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15273812> >.

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, n. 2, p. 101-120, Aug 2009. ISSN 1747-0277. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267832000001 >.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Curr Opin Microbiol**, v. 3, n. 5, p. 445-50, Oct 2000. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050440> >.

SAKATA, E. E. et al. [The serovars of *Leptospira interrogans* isolated from cases of human leptospirosis in São Paulo, Brazil]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 34, n. 3, p. 217-21, 1992 May-Jun 1992. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1342073> >.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, Dec 1977. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/271968> >.

SANTOS, J. V. et al. Binding of human plasminogen by the lipoprotein LipL46 of *Leptospira interrogans*. **Mol Cell Probes**, v. 37, p. 12-21, Feb 2018. ISSN 1096-1194. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29108931> >.

SILVA, L. P. et al. Evaluation of two novel leptospiral proteins for their interaction with human host components. **Pathog Dis**, v. 74, n. 5, Jul 2016. ISSN 2049-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27129366> >.

SIQUEIRA, G. H. et al. Characterization of three novel adhesins of *Leptospira interrogans*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 89, n. 6, p. 1103-16, Dec 2013. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23958908> >.

_____. *Leptospira interrogans* Lsa23 protein recruits plasminogen, factor H and C4BP from normal human serum and mediates C3b and C4b degradation. **Microbiology-Sgm**, v. 162, p. 295-308, Feb 2016a. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000373522200010 >.

_____. *Leptospira interrogans* Lsa23 protein recruits plasminogen, factor H and C4BP from normal human serum and mediates C3b and C4b degradation. **Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 295-308, Feb 2016b. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26614523> >.

_____. The recombinant LIC10508 is a plasma fibronectin, plasminogen, fibrinogen and C4BP-binding protein of *Leptospira interrogans*. **Pathog Dis**, v. 74, n. 2, Mar 2016. ISSN 2049-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26657108> >.

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. 405-20, Jul 1997. ISSN 0887-3585. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9223186> >.

SOUZA, N. M. et al. Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. **Microb Pathog**, v. 53, n. 3-4, p. 125-34, Sep 2012. ISSN 1096-1208. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22732096> >.

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. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000555> >.

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, May 1991. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2023259> >.

TEIXEIRA, A. F. et al. Features of two new proteins with OmpA-like domains identified in the genome sequences of *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122762, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25849456> >.

THOMAS, D. D.; HIGBIE, L. M. In vitro association of leptospires with host cells. **Infect Immun**, v. 58, n. 3, p. 581-5, Mar 1990. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2307512> >.

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. 2053-9, May 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20160016> >.

_____. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. **Infect Immun**, v. 74, n. 5, p. 2659-66, May 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622202> >.

VIEIRA, M. L. et al. Interaction of *Leptospira interrogans* with human proteolytic systems enhances dissemination through endothelial cells and protease levels. **Infect Immun**, v. 81, n. 5, p. 1764-74, May 2013. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23478319> >.

_____. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11259, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20582320> >.

_____. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. **J Infect**, v. 60, n. 1, p. 52-64, Jan 2010. ISSN 1532-2742. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19879894> >.

_____. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. **Microb Pathog**, v. 51, n. 5, p. 360-5, Nov 2011. ISSN 1096-1208. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21802507> >.

_____. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. **FEMS Microbiol Lett**, v. 352, n. 2, p. 129-39, Mar 2014. ISSN 1574-6968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24289724> >.

VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. Interaction of spirochetes with the host fibrinolytic system and potential roles in pathogenesis. **Crit Rev Microbiol**, p. 1-15, Apr 2015. ISSN 1549-7828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25914944> >.

VIEIRA, M. L. et al. Plasminogen acquisition and activation at the surface of *leptospira* species lead to fibronectin degradation. **Infect Immun**, v. 77, n. 9, p. 4092-101, Sep 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19581392> >.

WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat Immunol**, v. 2, n. 4, p. 346-52, Apr 2001. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11276206> >.

WIEDEMANN, C.; BELLSTEDT, P.; GÖRLACH, M. CAPITO--a web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data. **Bioinformatics**, v. 29, n. 14, p. 1750-7, Jul 2013. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23681122> >.

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. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24312361> >.

WOODWARD, M. P.; YOUNG, W. W.; BLOODGOOD, R. A. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. **J Immunol Methods**, v. 78, n. 1, p. 143-53, Apr 1985. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2580026> >.

WU, S.; SKOLNICK, J.; ZHANG, Y. Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. **BMC Biol**, v. 5, p. 17, May 2007. ISSN 1741-7007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488521> >.

YAN, W. et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. **Microbes Infect**, v. 11, n. 2, p. 230-7, Feb 2009. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19070678> >.

YAN, Y. et al. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to leptospira. **J Chin Med Assoc**, v. 66, n. 4, p. 224-30, Apr 2003. ISSN 1726-4901. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12854874> >.

YANG, H. L. et al. In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against *Leptospira interrogans*. **BMC Genomics**, v. 7, p. 293, 2006. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109759> >.

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 Science**, v. 13, n. 5, p. 1402-1406, May 2004. ISSN 0961-8368. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000221042200024 >.