Jupciana Martins Figueredo

**Avaliação do papel de duas proteínas de *Leptospira interrogans* na
patogênese da leptospirose**

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

São Paulo
2016

Jupciana Martins Figueredo

**Avaliação do papel de duas proteínas de *Leptospira interrogans* na
patogênese da leptospirose**

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Lucia Tabet
Oller do Nascimento

Versão corrigida. A versão original
eletrônica, encontra-se disponível tanto
na Biblioteca do ICB quanto na
Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

DADOS DE 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)

Figueredo, Jupciana Martins.

Avaliação do papel de duas proteínas de *Leptospira interrogans* na patogênese da leptospirose. / Jupciana Martins Figueredo; orientador (a) Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento.-- São Paulo, 2016.
96 p.

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

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Jupciana Martins Figueredo

Título da Dissertação: Avaliação do papel de duas lipoproteínas de *Leptospira interrogans* na patogênese da leptospirose

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

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição :

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep @icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO - CEP SH

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 658/14, referente ao projeto intitulado: "*Avaliação do papel de duas lipoproteínas de Leptospira interrogans na patogênese da leptospirose*" sob a responsabilidade de **Jupciana Martins Figueredo**, foi analisado na presente data pela CEP SH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por esta Comissão.

São Paulo, 29 de abril de 2014.

Prof. Dr. PAULO M.A ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Aos meus queridos pais, irmãos, esposo e
amado filho que estiveram juntos comigo
nessa jornada. Sem o apoio e amor de vocês
nunca teria percorrido e concluído esse
trabalho.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas bênçãos recebidas e graças alcançadas, e por ter me agraciado com uma família maravilhosa e pelas pessoas que passaram pelo meu caminho e que permitiram meu crescimento no âmbito profissional e pessoal.

Quero agradecer aos meus amados pais José e Claudenice, por terem dedicado todo amor, carinho, paciência e pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Meus queridos irmãos Claudineide, Claudivon e Jucier, que sempre apioram as minhas decisões.

Ao meu companheiro de todos os momentos Adriano, pelo apoio, confiança e paciência. Ao meu amado filho, José Henrique que nasceu no meio desta jornada para alegrar e renovar minhas forças e esperança.

Aos meus sobrinhos, Antônio Guilherme, Jucier Matheus, Monaliza, Arthur, Letícia, Gabriel, Davi e Paulo Otávio por acreditarem no meu sucesso.

À minha orientadora, Dra. Ana Lucia Tabet Oller Nascimento, agradeço pela oportunidade dada em seu laboratório, pela dedicação, paciência, incentivo e suporte para a realização do meu trabalho.

À minha coorientadora, Dra. Gabriela Siqueira, obrigada por ter me ensinado e por ter compartilhado seus conhecimentos para a realização e concretização do meu trabalho da melhor forma possível, sempre procurando me ajudar a solucionar os problemas com muita paciência e dedicação.

A todos os meus colegas do Laboratório de Biotecnologia Molecular II do Instituto Butantan, Dra. Aline, Priscila, Me. Luis Guilherme, Dra. Mônica, Dra. Raquel, Jadson, Leandro, Maria Fernanda, Amanda e Fernanda, por todos os momentos que passamos juntos.

Aos meus Avôs, José Alves, Angelina e Jaci pelo carinho e dedicação.

Aos meus cunhados, Ademar, Leidiane, Marta e Alex e minha sogra Célia pelo apoio e incentivo.

Aos professores do curso de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT pela contribuição em minha formação.

À Dra. Eliete C. Romero do Instituto Adolfo Lutz pela colaboração, fornecendo soro de pacientes.

Ao professor Dr. Silvio A. Vasconcellos, Zenáide Maria de Moraes e Gisele Souza do Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, pela colaboração com as culturas de leptospiros.

Ao Dr. Enéas de Carvalho, pela paciência e dedicação nos ensaios de Dicroísmo circular, realizados no laboratório de Biotecnologia Molecular I do Instituto Butantan.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa sob o número: 12/23913-9, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo, bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Butantan.

Agradeço a todos!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”
(Theodore Roosevelt)

RESUMO

FIGUEREDO, J. M. **Avaliação do papel de duas proteínas de *Leptospira interrogans* na patogênese da leptospirose** 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Leptospirose é uma zoonose mundial que acomete várias espécies de mamíferos, incluindo humanos, causada por espécies de bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Anualmente, são relatados ao Ministério da Saúde (SINAN/SVS/MS), cerca de 4.000 casos, os quais ocorrem como surtos epidêmicos nas épocas de chuva. Possui um quadro de manifestação clínico muito variado, podendo apresentar desde sintomas comuns as doenças tropicais como febre, calafrios, cefaleia, dores musculares, enjoo, vômitos e diarreia, até uma síndrome severa de infecção multissistêmica conhecida como síndrome de Weill. O sequenciamento do genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni e a bioinformática permitiu a identificação de proteínas potencialmente envolvidas na patogênese desta bactéria, como lipoproteínas e proteínas de membrana externa. Desse modo, foram selecionados genes sem função conhecida LIC10377, LIC11122, LIC11184 e LIC12287, tendo como critério principalmente a predição de localização das proteínas na membrana. Estas sequências foram clonadas e a proteínas expressas utilizando a *Escherichia coli* como sistema hospedeiro. Os fragmentos de DNA referentes aos genes foram amplificados por PCR, clonados no vetor pGEM-T Easy e subclonados no vetor de expressão pAE, nos sítios de restrição de clonagem e purificadas pela técnica de cromatografia de afinidade a metal. Não foi possível dar continuidade aos estudos com as sequências codificadoras LIC11184 e LIC10377 por problemas na clonagem e na expressão das proteínas, respectivamente. A proteína rLIC12287 foi expressa na forma de corpúsculos de inclusão e solubilizada com ureia; já a proteína rLIC11122 teve uma maior expressão sob a forma solúvel. Após purificação e diálise, foi verificado por dicroísmo circular que as proteínas recombinantes apresentavam estrutura secundária na forma de mistura de folha beta e randômica. Resultados de localização sugerem que as duas sequências codificadoras estão localizadas na membrana externa da bactéria. A proteína recombinante rLIC11122 foi reconhecida por soros de pacientes diagnosticados com leptospirose, já a rLIC12287 apresentou uma menor reatividade, sugerindo que a primeira é expressa durante a infecção, podendo ser importante para o reconhecimento de células imunológicas. As proteínas interagem com laminina, e por apresentarem característica de adesina foram renomeadas de Lsa19 e Lsa14 (*Leptospiral surface adhesin*, seguido da massa molecular aproximada em kDa), elas também interagem com o plasminogênio, sendo estas interações dose-dependentes e saturáveis, com constante de dissociação próximo ao de adesinas já descritas na literatura. A interação das proteínas com plasminogênio gera plasmina na presença do ativador de plasminogênio, uPA. Os dados sugerem que as duas proteínas interagindo com componentes do hospedeiro podem estar envolvidas nos processos de adesão/invasão da bactéria. A proteína codificada pelo gene LIC11122 foi recentemente anotada como fator sigma. A presença deste fator na superfície da bactéria sugere que esta proteína possa ser uma *moonlight*.

Palavras-chave: *Leptospira*. Leptospirose. Proteínas recombinantes.

ABSTRACT

FIGUEREDO, J. M. **Role of two *Leptospira interrogans* lipoproteins in the pathogenesis of leptospirosis.** 2016. 95 p. Dissertation (Master in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Leptospirosis is a worldwide zoonosis that affects several species of mammals, including humans, caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*. Annually, about 4,000 cases are reported to the Ministry of Health (SINAN / SVS / MS), which occur predominantly during the rainy season. The disease presents a diverse clinical manifestation ranging from common tropical diseases symptoms such as, fever, chills, headache, muscle aches, nausea, vomiting and diarrhea to severe multisystem syndrome infection, known as Weill syndrome. The sequencing of the genome of *L. interrogans* serovar Copenhageni and bioinformatics allowed the identification of proteins potentially involved in the pathogenesis of these bacteria, such as, outer membrane proteins, including lipoproteins. Therefore, genes of unknown function and predicted to be located at the bacterial cell membrane were selected from the genome sequences, LIC10377, LIC11122, LIC11184 and LIC12287. The DNA fragments of the genes were amplified by PCR, cloned into the pGEM-T Easy vector and subcloned into the pAE expression vector, cloning restriction sites and purified by the metal affinity chromatography technique. Studies with the coding sequences LIC11184 and LIC10377 could not be continued because of cloning and protein expression problems, respectively. The rLIC12287 protein was expressed as inclusion corpuscles and solubilized with urea. Where as the rLIC11122 protein had a greater expression in the soluble form. After purification and dialysis, it was verified by circular dichroism that the recombinant proteins had secondary structure in the form of a beta and random leaf blending. Localization results suggest that the two coding sequences are located on the outer membrane of the bacterium. Recombinant protein rLIC11122 was recognized by sera from patients diagnosed with leptospirosis, whereas rLIC12287 showed a lower reactivity, suggesting that the former is expressed during infection and may be important for the recognition of immunological cells. The proteins interact with laminin, and because of the adhesin characterization, they have been renamed Lsa19 and Lsa14 (*Leptospiral surface adhesin* followed by the approximate molecular mass in kDa), they also interact with plasminogen, being these interactions dose-dependent and saturable, with a constant of dissociation of the same order of magnitude that of adhesins already described in the literature. The interaction of proteins with plasminogen generates plasmin in the presence of the plasminogen activator, uPA. The data suggest that the two proteins interacting with host components may be involved in the bacterial adhesion / invasion processes. The protein encoded by the LIC11122 gene was recently annotated as a sigma factor. The presence of this factor on the surface of the bacterium suggests that this protein may be moonlight.

Keywords: *Leptospira*. Leptospirosis. Recombinant proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura de <i>Leptospira interrogans</i>	19
Figura 2 - Modelo da estrutura e composição da membrana de <i>Leptospira spp.</i>	20
Figura 3 - Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy.....	34
Figura 4 - Mapa do vetor de expressão pAE.....	35
Figura 5 - Filograma das sequências de aminoácidos codificadas pelos genes LIC10377, LIC11122, LIC11184 e LIC12287	54
Figura 6 - Análise dos fragmentos de DNA obtidos por amplificação PCR.....	55
Figura 7 - Análise de restrição enzimática dos DNAs selecionados que foram obtidos após a ligação dos produtos de pcr com o vetor de clonagem pGEM-T easy.	56
Figura 8 - Análise dos fragmentos de dna após digestão do plasmídeo pAE-LIC em gel de agarose..	57
Figura 9 - Eletroferograma das sequências de DNA dos genes estudados..	58
Figura 10 - Análise da expressão das proteínas recombinantes em cepas de <i>E. Coli.</i> , por SDS-page 12% e 15%.....	59
Figura 11 - Detecção das recombinantes por anticorpo monoclonal antipoli-histidina	60
Figura 12 - Estimativa da concentração das proteínas recombinantes purificadas.	61
Figura 13 - Espectros de dicroísmo circular das proteínas recombinantes purificadas.....	62
Figura 14 - Produção de anticorpos em camundongos imunizados com as proteínas recombinantes ..	64
Figura 15 - Detecção das proteínas recombinantes por <i>western blotting</i> utilizando o antissoro policlonal anti-rLIC..	65
Figura 16 - Avaliação da proliferação de esplenócitos	66
Figura 17 - <i>Screening</i> para detecção das proteínas nativas em bactérias M20.	68
Figura 18 - Detecção indireta das proteínas nativas codificadas pelos genes LIC11122 e LIC112287 em leptospiros intactas	69
Figura 19 - Ensaio de acessibilidade das proteínas recombinantes por proteinase K (pK).....	70
Figura 20 - Reatividade dos soros de humanos diagnosticados com leptospirose com as proteínas Lsa19 e Lsa14.....	71
Figura 21 - Reatividade de soros de hamsters infectados com as proteínas recombinantes estudadas..	72
Figura 22 - Adesão das proteínas recombinantes com os componentes da matriz extracelular.....	73
Figura 23 - Especificidade da adesão das proteínas recombinantes à laminina.	74
Figura 24 - Caracterização da ligação das proteínas recombinantes à laminina	75
Figura 25 - Envolvimento dos resíduos de açúcar da laminina e sua interação com as proteínas recombinantes.....	76
Figura 26 - Adesão das proteínas recombinantes com os componentes do plasma.	78
Figura 27 - Especificidade da adesão das proteínas recombinantes ao plasminogênio.	79
Figura 28 - Caracterização da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio.....	80
Figura 29 - Envolvimento das forças iônicas na ligação das proteínas recombinantes com o plasminogênio.....	82
Figura 30 - Influência dos resíduos de lisina na ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio.	82
Figura 31 - Avaliação da formação de plasmina.....	83
Quadro 1 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes por PCR.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise comparativa de proteínas estudadas pelo grupo.....	30
Tabela 2 - Análise <i>in silico</i> das sequências de aminoácidos codificadas pelos genes LIC10377, LIC11122, LIC11184 E LIC12287.	49
Tabela 3 - Tabela como análise dos espectros de CD e da predição com base nas sequências de aminoácidos obtidos pelo programa capito.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs - Absorbância
ACA - Ácido Aminocapróico
BSA - Albumina de Soro Bovino
Brdu - Bromodesoxiuridina
CAM - *Cell adhesion molecules*
C4BP - C4 *binding protein* (proteína ligante de C4)
CD - Dicroísmo Circular
ConA - Concanavalina A
Da - Dalton
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DO - Densidade óptica
ADTA - Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*
EMJH - Meio de Cultura Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris
Fiocruz - Fundação Osvaldo Cruz
IFN - Interferon
Ig - Imunoglobulina
IPTG - Isopropil- β -tiogalactosídeo
Kb - Kilobase
LB - Meio Luria-Bertani contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de triptona e 1% de NaCl
LIG - *Leptospiral immunoglobulin-like*
LPHS - Síndrome pulmonar hemorrágica associada à leptospirose
Lsa - *Leptospiral surface adhesin*
LPS - Lipopolissacarídeo
MAT - Teste de microaglutinação
MEC - Matriz extracelular
OPD - o-fenilenodiamina
OMP - Proteína de membrana externa
OMS - Organização mundial de saúde
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
Pb - Pares de Base
PBS - Tampão fosfato salino
PBS *ls* - PBS *low salt*
PBS-T - PBS contendo 0,05% Tween 20
PCR - *Polymerase chain reaction* (reação de cadeia da polimerase)
pH - Potencial hidrogeniônico
PK - Proteinase K
PMSF - Fenilmetilsulfonilfluor
RBS - Sítio de ligação ao ribossomo
RNA - Ácido ribonucleico
RPMI - Meio *Roswell Park Memorial Institute*
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SINAN/SVS - Sistema nacional de agravos e notificação da secretaria de vigilância sanitária
TA - Temperatura de anelamento
TAE - Tris-acetato EDTA
Tm - Temperatura de melting
TNF - Fator de necrose tumoral
uPA - Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Epidemiologia da leptospirose	17
1.2 Microbiologia da <i>Leptospira</i> spp.	18
1.3 Taxonomia e classificação	21
1.4 Diagnóstico e tratamento da leptospirose	21
1.5 Genômica da <i>Leptospira</i> spp.	23
1.6 Vacinas e candidatos vacinais	24
1.7 Patogenicidade e fatores de virulência	26
2 OBJETIVO	31
2.1 Objetivos específicos	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Cepas bacterianas <i>Leptospira</i> spp.	32
3.2 <i>Escherichia coli</i>	32
3.3 Soros	33
3.4 Extração do DNA genômico da <i>Leptospira interrogans</i>	33
3.5 Vetores de clonagem e expressão	34
3.6 Análises <i>in silico</i> das sequências codificadoras (CDS)	35
3.7 Amplificação dos genes por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	36
3.8 Clonagem e Expressão das proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	36
3.9 Purificação e diálise das proteínas recombinantes	38
3.10 Espectroscopia circular (CD)	39
3.11 Detecção de anticorpos IgG em soros de humanos diagnosticados com leptospirose e hamsters experimentalmente infectados com <i>Leptospira</i>	39
3.12 Produção de antissoros policlonais em camundongos	40
3.13 Avaliação <i>in vitro</i> dos efeitos das proteínas recombinantes sobre esplenócitos de camundongos	41
3.14 Ensaios de immunoblotting	42
3.15 Ensaio de interação das proteínas recombinantes com componentes da matriz extracelular (MEC) e do plasma humano	42
3.16 Curvas de dose-dependência da ligação das proteínas recombinantes com MEC	43
3.17 Inibição da interação das proteínas recombinantes com componentes após incubação com antissoro correspondente	43
3.18 Interação das proteínas recombinantes desnaturadas com componentes da (MEC e plasma humano)	44
3.19 Efeitos do metaperiodato na ligação das proteínas recombinantes à laminina	44
3.20 Caracterização da ligação da proteína recombinante com o PLG	45
3.21 Inibição da ligação do plasminogênio por NaCl	45
3.22 Ensaio de atividade enzimática da plasmina	46
3.23 Ensaio de detecção das proteínas correspondentes em bactérias intactas	46
3.24 Ensaio de detecção das proteínas recombinantes em diferentes cepas de <i>Leptospira</i>	47
3.25 Ensaio de acessibilidade por proteinase K (pK)	47
3.26 Comitê de Ética animal e humana	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Análise <i>in silico</i> da presença dos genes em <i>Leptospira</i> spp.	52
4.2 Clonagem e expressão dos genes selecionados	55
4.3 Avaliação da expressão das proteínas recombinantes	58
4.4 Purificação e diálise das proteínas recombinantes	60
4.5 Avaliação da estrutura secundária das proteínas recombinantes rLIC11122 e rLIC12287 por dicroísmo circular	62
4.6 Avaliação da atividade imunológica das proteínas recombinantes em camundongos	63
4.7 Avaliação da expressão e localização celular	66
4.7.1 Ensaio de detecção das proteínas nativas em diferentes cepas de <i>Leptospira</i>	67
4.7.2 Ensaio de acessibilidade por Proteinase K (PK)	69

4.8 Reatividade com soro de humanos diagnosticados com leptospirose e hamsters infectados experimentalmente	70
4.9 Adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular	72
4.10 Interações das proteínas recombinantes com componentes do plasma humano	76
4.11 Conversão do plasminogênio em plasmina	82
5 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS*	85

1 INTRODUÇÃO

Leptospirose é uma zoonose mundial que acomete várias espécies de mamíferos, incluindo humanos, é causada por espécies patogênicas de *Leptospira* ssp., A incidência de casos no mundo é cerca de um milhão anualmente, com uma mortalidade de aproximadamente 10% (COSTA et al., 2015). A contaminação por *Leptospira* pode ocorrer de forma direta pelo contato com a urina de animais infectados ou indireta pela exposição em ambientes contaminados como água, solo e alimentos. A inalação de água ou de aerossóis também pode resultar em infecção por meio das membranas mucosas do trato respiratório. Os roedores desempenham o papel de principais reservatórios da doença nos centros urbanos, pois mantêm as leptospiros nos rins, eliminando-as vivas pela urina contaminando diversos ambientes. A espécie *Rattus norvegicus* merece destaque por ser um dos principais portadores de *Leptospira interrogans* sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae, que são as principais causadoras de leptospirose no Brasil (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; MAROTTO et al., 1999; SPICHLER et al., 2007; YANG, 2007).

As leptospirosas penetram no indivíduo através das mucosas ou por meio de pequenos ferimentos encontrados na pele. Também tem sido observados casos de penetração com a pele íntegra, mas com poros dilatados, quando há contato prolongado com o ambiente úmido contaminado (FAINE et al., 1999; GOUVEIA et al., 2008).

A leptospirose apresenta uma amplitude de sintomas que acarreta em seu subdiagnóstico clínico, gerando um baixo índice de casos notificados. Pode apresentar tanto manifestações clínicas leves quanto severa. Os sintomas iniciais são febre, dores de cabeça, dores musculares, náuseas e vômitos, sendo confundidos na maioria das vezes com viroses. Cerca de 5% a 15% dos indivíduos infectados evoluem para uma forma severa da doença, conhecida como síndrome de Weil, que é caracterizada por complicações em múltiplos órgãos, que acarretam em hemorragia, disfunção renal e hepática, além de dano cardiovascular, e apresenta taxa de mortalidade de 15%. Outra forma da doença que vem sendo relatada é a Síndrome Pulmonar Hemorrágica Associada à Leptospirose (LPHS), que é caracterizada por um sangramento intenso no pulmão. Essa forma da doença apresenta evolução rápida e está taxa de mortalidade superior a 70% dos casos. Alguns pacientes que desenvolveram a síndrome hemorrágica pulmonar apresentam altas concentrações de DNA de *Leptospira* nos pulmões, embora o número de bactérias intactas seja pequeno (GOUVEIA et al., 2008; LEVETT, 2001; SEGURA et al., 2005; TOYOKAWA et al., 2011).

É importante ressaltar que a severidade da leptospirose está relacionada à cepa ou sorovar infectante de *Leptospira* e para algumas cepas o tamanho do inóculo pode ser impactante, assim como a idade e imunidade do indivíduo infectado (BHARTI et al., 2003).

1.1 Epidemiologia da leptospirose

A incidência de Leptospirose é relacionada com fatores ambientais. Assim, na área urbana, especialmente no período chuvoso, as inundações são os principais fatores de risco para a ocorrência de surtos da doença (TASSINARI et al., 2004). A zoonose é endêmica, em alguns países tropicais e subtropicais estima-se que cerca de 70% dos casos ocorrem nessas regiões (COSTA et al., 2015; PAPPAS et al., 2008). Em países em desenvolvimento surtos epidêmicos ocorrem sazonalmente nas regiões urbanas, estando ligados às péssimas condições de saneamento básico e à grande incidência de chuvas e enchentes que promovem maior disseminação da doença (COSTA et al., 2015; SAKATA et al., 1992). Nos países desenvolvidos, a doença está mais relacionada às atividades ocupacionais (serviços de água e esgoto, agricultura e pecuária, veterinários, entre outros) e recreacionais (CRUZ; VARGAS; LOPES, 2009; SARKAR et al., 2012).

No Brasil o crescimento desordenado nos centros urbanos, junto com a produção de lixo, fornece condições ambientais favoráveis para a reprodução dos roedores, que são os principais carreadores da doença (TASSINARI et al., 2004).

No período de 2010 a 2014 foram confirmados no Brasil 20.810 casos de leptospirose, tendou uma média anual de 4.162 casos confirmados. O número de óbitos foi de 1.694, com média de 339 óbitos por ano. O maior número de casos da doença foi observado nas regiões Sudeste (7.457) e Sul (6.030), seguidos pelas regiões Norte (3.929), Nordeste (3.141) e Centro-Oeste (253). Os estados com maior percentual de casos confirmados foram São Paulo (20,9%), Santa Catarina (10,7%), Rio Grande do Sul (10,6%) e Acre (10,5%), dados do Sistema Nacional de Agravos e Notificação da Secretaria de Vigilância Sanitária, 2016 (SINAN/SVS/MS). Esses números podem ser subestimados, considerando que muitos casos de leptospirose não são relatados aos órgãos de saúde, devido ao difícil diagnóstico ou falta de atendimento. A notificação da unidade saúde é encaminhada às vigilâncias epidemiológicas por meio da ficha, que contém dados demográficos, antecedentes epidemiológicos e clínicos dos casos, e após 60 dias são encaminhados ao Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (SNVE) da leptospirose.

Além do impacto na saúde pública, a leptospirose é a principal causa de perda econômica no agronegócio. No Brasil, a leptospirose bovina é endêmica, sendo bastante frequente nos rebanhos de corte e leite. As manifestações clínicas da doença como: infecções fetais que provocam abortos, partos de natimortos, uveíte e o nascimento de neonatos fracos determinam alterações principalmente no campo reprodutivo e na produção de alimentos nobres como a carne, o leite, e ainda de produtos de interesse industrial, tais como a lã e o couro. Embora a taxa de mortalidade nesta espécie seja baixa, em torno de 5%, a morbidade geralmente é elevada. Estudos de prevalência da doença demonstram considerável variação entre rebanhos de diferentes regiões do país, sendo os maiores índices registrados nas regiões, com grandes precipitações pluviométricas, podendo ocorrer em solos neutros ou alcalinos (HAMOND et al., 2012; PINNA et al., 2010; RADOSTITS, 2002). A sorovariedade mais prevalente que tem variado entre *hardjo* e *wolffi* pode ser atribuída a fatores metodológicos como ponto de corte, modalidade de teste e coleção de antígenos empregada, embora não possa ser excluída a hipótese de expansão de uma sorovariedade na dependência de fatores ambientais ligados a manejo e à movimentação de animais (FÁVERO et al., 2001).

1.2 Microbiologia da *Leptospira* spp.

As bactérias do gênero *Leptospira* são espiroquetas finas e rijamente enroladas em forma espiralada que medem aproximadamente 0,1 µm de diâmetro e entre 6-20 µm de comprimento, podendo compreender tanto espécies patogênicas quanto saprofíticas pertencentes à família *Leptospiraceae* e ordem *Spirochaetales* (FAINE et al., 1999; LI, C. et al., 2000). Apresentam uma característica morfológica peculiar, uma curvatura em suas extremidades que faz a bactéria se assemelhar a um ponto de interrogação diferenciando-as de outras espiroquetas (Figura 1) (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

São bactérias extremamente móveis, contendo dois flagelos no espaço periplasmático que partem das extremidades da célula e terminam no centro. Desta forma, conferem mobilidade e forma às leptospiros (PICARDEAU et al., 2008). Os filamentos do polímero flagelina das leptospiros são diferentes de outras bactérias, pois, apresentam uma estrutura complexa com quatro genes *flaB* e dois genes *flaA* (MALMSTRON et al., 2009). Bactérias mutantes para o gene *flaA*, apresentaram uma capacidade de virulência reduzida em modelo animal. Também foi observada uma menor motilidade e forma celular diferente (LAMBERT et al., 2012). Alguns estudos já apresentaram a importância da motilidade, sendo a mesma considerada um fator de virulência, visto que bactérias recém-isoladas possuem uma

maior mobilidade quando comparadas com bactérias mantidas em condições *in vitro*. É importante ressaltar que a mobilidade indica uma facilidade de deslocamento em meios semelhantes aos tecidos conjuntivos (JACKSON et al., 1993).

As leptospiros podem sobreviver em ambientes como: solos úmidos, lamas pântanos, córregos e rios por longos períodos, mas não são capazes de sobreviver em ambientes secos e com pH ácidos (TRUEBA et al., 2004).

Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura de *Leptospira interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae*. A bactéria está sobre a superfície de uma membrana de filtração de 0,2 μ m.

Fonte: Adaptado de (LEVETT, 2001).

Uma singularidade das leptospiros é compartilhar características tanto de bactérias Gram-negativas, quanto Gram-positivas. Possui uma membrana dupla e presença de lipopolissacarídeos (LPS) na superfície da membrana externa assim como as bactérias Gram-negativas, ao passo que a forte associação da membrana plasmática com a parede celular composta de peptideoglicanos é uma característica semelhante à de bactérias Gram-positivas (Figura 2) (FAINE et al., 1999; HAAKE; MATSUNAGA, 2010; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Embora apresentem tais características, as leptospiros raramente são coradas pelo método de Gram. No entanto, podem ser coradas por sais de prata ou observadas diretamente em microscopia óptica de campo escuro, ou contraste de fase (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

O LPS presente na membrana é um grande diferencial das leptospiros em relação às outras espiroquetas como *Treponema pallidum*, *T. denticola* e *Borrelia burgdorferi*, sendo um importante fator de virulência para estas bactérias. Eles possuem estrutura e resposta imune similar ao LPS de outras bactérias Gram-negativas. Porém, apresentam uma toxicidade menor para células animais, sendo cerca de 10 vezes menos letal para camundongos do que o LPS de *Escherichia coli* (MORIEL et al., 2010).

O LPS de *Leptospira* é composto por lipídio A, pela parte central conservada e polissacarídeo ou antígeno O, que é variável (BHARTI et al., 2003; CHARON E GOLDSTEIN, 2002; ELLIS et al., 1983; FAINE et al., 1999; LIAO et al., 2009; MURRAY et al., 2010). Um dos fatores que contribuem para a susceptibilidade dos seres humanos sofrerem infecção por leptospiros é a dificuldade do seu sistema imune inato em detectar o LPS. Uma das explicações pode estar na composição do lipídio A, que apresenta um fosfato metilado diferentemente do lipídio A de quaisquer outras bactérias (QUE-GEWIRTH et al., 2004; WERTS et al., 2001; YANG, 2007), o que acaba promovendo seu reconhecimento e sinalização via receptor do tipo *Toll 2* (TLR2) ao invés do usual reconhecimento pelo TLR4 (FAINE et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Figura 2 - Modelo da estrutura e composição da membrana de *Leptospira* spp.. As leptospiros apresentam na sua estrutura celular: (IM) membrana interna, voltada para o citoplasma, espaço periplasmático (PS), onde se localizam os flagelos periplasmáticos (F), e membrana externa (OM), composta pelas lipoproteínas e proteínas transmembranares e pelos lipopolissacarídeos. As leptospiros possuem característica tanto de bactérias Gram-positivas, a associação da camada de peptidoglicano (PG) (seta vermelha) com a IM, quanto de Gram-negativas, presença de LPS na membrana externa (seta preta).
Fonte: Adaptado de (FERNANDES et al., 2016).

As proteínas apresentadas na Figura 2, ancoradas sobre a membrana extracelular, já foram estudadas quanto as suas prováveis participações na patogenicidade e virulência das leptospiros, e muitas se mostraram importantes para tais processos.

As bactérias do gênero *Leptospira* são aeróbias obrigatórias e apresentam crescimento lento tanto em meio de cultura sólido quanto líquido, com tempo de geração

variando entre 6-8 horas. O crescimento ótimo dessas bactérias é observado em temperaturas entre 28 °C e 30 °C e pH entre 7,2 e 7,6 em meio suplementado com ácidos graxos de cadeia longa, vitamina B1 e B12 e sais de amônio (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Os ácidos graxos são utilizados como única fonte de carbono e energia, sendo degradados por meio de β -oxidação. O meio de cultura comumente utilizado no cultivo de leptospiros é o meio Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris (EMJH), que contém ácido oleico, albumina sérica e polisorbato (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; NASCIMENTO et al., 2004a).

1.3 Taxonomia e classificação

As leptospiros são bactérias que compõem a ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae* e gênero *Leptospira*. São classificadas de duas formas distintas: sorologicamente e geneticamente.

A classificação sorológica é baseada na resposta imune heterogênea para os diversos LPS presentes na membrana da bactéria (LEVETT, 2001; PLANK; DEAN, 2000), pela qual as leptospiros são agrupadas em 25 sorogrupos e mais de 250 sorovares patogênicos de acordo com o teste de microaglutinação (MAT) (AHMED et al., 2006).

A classificação genética indica a existência de 22 espécies, divididas entre patogênicas, saprofíticas e intermediárias. Esta classificação é baseada principalmente na hibridização de DNA. Baseando-se nesta classificação, o grupo das espécies saprofíticas contém 7 representantes (*L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. yanagawae* e *L. idonii*) que formam o ramo mais afastado filogeneticamente. O grupo das espécies patogênicas engloba 9 espécies (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, *L. kmetyi* e *L. alstonii*). Outro ramo evolucionário é compreendido pelo grupo das chamadas espécies intermediárias (*L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffi* e *L. licherasiae*), o qual contém 5 espécies de patogenicidade pouco estabelecida. Embora seja difícil correlacionar às duas classificações, aproximadamente metade dos sorovares patogênicos está classificada em *L. interrogans* ou *L. borgpetersenii* (FOUTS et al., 2016; LEHMANN et al., 2014; LEVETT, 2001).

1.4 Diagnóstico e tratamento da leptospirose

O diagnóstico da leptospirose pode ser alcançado por detecção direta do organismo ou dos seus componentes em fluídos e tecidos corporais utilizando técnicas como isolamento da *Leptospira* em culturas ou detecção de anticorpos específicos (FAINE et al.,

1999). As mais utilizadas envolvem a detecção de anticorpos por meio do teste de microaglutinação (MAT) e ensaio imunoenzimático.

O MAT é o teste padrão ouro, recomendado pela Organização Mundial de Saúde, 2003 (OMS), para o diagnóstico de leptospirose; é sensível ao sorovar ou sorogrupos de *Leptospira* spp. (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007). Entretanto, este diagnóstico não é capaz de detectar a doença em sua fase inicial, pois busca a presença de anticorpos contra os LPS de *Leptospira* spp., principalmente do tipo IgG, os quais são gerados em 7-10 dias após a exposição com o patógeno (LANGSTON; HEUTER, 2003). Para realizar o MAT, diluições seriadas do soro do paciente com suspeita de leptospirose são misturadas com suspensões vivas de *Leptospira* spp., sendo considerado o título do soro a maior diluição onde a aglutinação é 50%. Apesar de atender algumas das características exigidas para um bom exame diagnóstico laboratorial, como a alta sensibilidade e especificidade, é uma técnica demorada e exige a manutenção de diversas culturas bacterianas de diferentes sorovares, além de pessoas capacitadas para sua execução, o que acaba restringindo sua realização em laboratórios de referência e passível de variação do resultado de acordo com o laboratório. Além disso, esse teste não consegue diferenciar os anticorpos gerados por infecção ou vacinação, tornando-se um problema no caso de animais, visto que vacinas veterinárias são compostas de uma preparação de leptospirosas mortas ou inativadas (BHARTI et al., 2003; CHAPPEL et al., 2004; GAZI et al., 2011; LEVETT, 2001; MERIEN et al., 2005, 2006; PICARDEAU, 2103; VIJAYACHARI; SEHGAL, 2000; WANG; JIN; WEGRZYN, 2007).

Outra opção para o diagnóstico durante a fase inicial da doença, quando ainda não é possível realizar o teste MAT, é o ensaio imunoenzimático indireto. Este teste tem como vantagens a existência de kits comerciais e ser de fácil execução, pois não necessita de habilidades especiais, os reagentes podem ser estocados por longos períodos sem perderem a reatividade e a capacidade de distinção entre uma infecção ocorrida no passado e uma recente por meio da detecção de imunoglobulinas específicas da classe IgM e IgG. Porém, por ser gênero específico, esse teste detecta somente a presença da bactéria, não sendo apropriado para a identificação do sorogrupo e da sorovariedade. Dessa forma, a utilização do ELISA como método exclusivo de diagnóstico, substituindo o MAT, não é recomendado (LEVETT, 2001; MELO et al., 2011; TURNER, 1970).

Durante a fase inicial, quando as leptospirosas ainda se encontram na corrente sanguínea, podemos observar às bactérias em amostras clínicas em microscópio óptico de campo escuro; porém trata-se de um método pouco preciso (FAINE et al., 1999; TURNER; MOHUN, 1970). Esse teste pode apresentar interpretações errôneas, visto que as espiroquetas em geral

possuem um movimento Browniano muito semelhante à fibrina o que pode gerar diagnósticos errôneo (D'ANDREA et al., 2012).

Outra possibilidade para diagnóstico da leptospirose em sua fase inicial é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que permite a detecção e amplificação do DNA específico do gênero *Leptospira* de diversos tecidos ou fluidos corpóreos. Existem muitos ensaios objetivando a amplificação de genes do RNAr 16S e 23S (JOUGLARD et al., 2006; LA SCOLA et al., 2006; LIU et al., 2006; PALANIAPPAN et al., 2006; REITSTETTER, 2006; ROMERO; YASUDA, 2006), bem como genes que codificam proteínas como, OmpL1, DNA girase, RpOB, proteínas Lig e LipL32 (BABER; STUART, 1946; MCCLAIN et al., 1984). Essa técnica não permite a detecção do sorovar causador da doença. Outras dificuldades encontradas se baseiam no fato de que muitos laboratórios não são equipados para realizar tais testes e pode ocorrer contaminação por DNA exógeno, acarretando em falso-positivo (CHAGAS-JUNIOR et al., 2012).

Depois de diagnosticada a leptospirose, o tratamento envolve a utilização de antibióticos como oxitetraciclina, doxiciclina e penicilina (MCCLAIN et al., 1984; SEHGAL et al., 2000; TAKAFUJI et al., 1984; WATT et al., 1988). A antibioticoterapia parece reduzir o avanço da doença (a exemplo de duração da hipertermia, tempo de normalização da função renal e tempo de hospitalização) e a ocorrência de sequelas. O antibiótico pode prevenir a ocorrência de infecção sintomática e a evolução para as manifestações mais graves da doença, por isso seu uso é recomendado embora ainda seja um assunto controverso, uma vez que muitos casos de leptospirose severa se resolvem espontaneamente (BHARTI et al., 2003; BRETT-MAJOR; COLDREN, 2012; GRIFFITH; HOSPENTHAL; MURRAY, 2006; KATZ et al., 2001; LEVETT, 2001; VINETZ, 2003; WONGSRICHANALAI et al., 2003).

Nos casos graves, nos quais há complicações renais, respiratórias ou hemorrágicas, os pacientes devem ser encaminhados a hospitais que disponham de capacidade para realizar procedimentos como diálise e terapia intensiva (LJUNGH; MORAN; WADSTRÖM, 1996; PATTI; HÖÖK, 1994; PAUSA et al., 2003).

1.5 Gênômica da *Leptospira* spp.

O avanço tecnológico permitiu o desenvolvimento de uma nova estratégia, a vacinologia reversa, que utiliza a bioinformática para detectar possíveis candidatos vacinais, permitindo a identificação de proteínas-alvo e determinando a sua provável localização no microrganismo. Com isso, é possível estudar a variabilidade genética dos prováveis alvos

vacinais para se conseguir resultados mais promissores (RAPPUOLI; 2000). As sequências de genomas disponíveis, combinadas com as ferramentas de bioinformática e técnicas de DNA recombinante, tem permitido a predição de proteínas *in silico* e a sua produção em laboratório, independentemente da sua abundância e sem a necessidade de cultivar o microrganismo *in vitro*. 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 o *Neisseria meningitidis* do grupo B causador da meningite B (PIZZA et al., 2000; TETTELIN et al., 2000), recentemente foi liberada no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2015 (ANVISA).

O sequenciamento do genoma de espécies patogênicas de *Leptospira* (*L. interrogans* e *L. borgpeterseenii*) e da espécie saprofítica (*L. biflexa*) permitiu um grande avanço no entendimento da biologia básica e do processo de patogênese desta bactéria no início dos anos 2000 (BULACH et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2004ab; PICARDEAU, 2008; REN et al., 2003). Atualmente mais 20 espécies de leptospiros já tiveram seu genoma completamente sequenciado, inclusive a espécie intermediária *L. licerasiae* (FOUTS et al., 2016).

Recentemente, a análise comparativa do genoma de 20 espécies de *Leptospiras* demonstrou que bactérias patogênicas, intermediárias e saprofíticas, apresentaram números diferentes de genes específicos (637, 418 e 321 respectivamente), e o maior número de genes compartilhados entre os dois primeiros grupos citados acima (369). Comparações binárias entre *Leptospira* patogênicas e intermediárias com saprofíticas revelaram que apenas 52 e 78 genes são compartilhados entre si, respectivamente. As categorias funcionais que mais se destacaram entre os genes compartilhados entre as espécies patogênicas e intermediárias foram: biossíntese de cofatores, grupos prostéticos metabolismo de fosfolipídios, elementos móveis e extracromossômicos. Os genes específicos dos grupos apresentaram papel funcional, envolvido no processo de metabolismo energético, regulação de genes, transdução de sinal, o destino da proteína, envelope celular, e as funções de transporte (FOUTS et al., 2016).

1.6 Vacinas e candidatos vacinais

As medidas de controle da leptospirose são direcionadas ao controle populacional dos roedores (antirratização e desrratização) melhoraria das condições de infraestrutura e higiênico-sanitária da população e meio ambiente (GOUVEIA, et al 2003). As dificuldades de implantações dessas medidas exigem métodos de profilaxia mais eficazes contra a leptospirose. O desenvolvimento de uma vacina é a melhor estratégia contra a doença.

A maioria das vacinas para prevenir a doença clínica causada por leptospirosas são projetadas para uso em espécies animais, em vez de seres humanos (CHEN, 1985). A imunização de seres humanos tem sido geralmente restrita aos indivíduos de alto risco e apenas em alguns países como Cuba, China, Japão e França. Essas vacinas são baseadas em bactérias inativadas por agentes químicos (formaldeído, fenol) ou agentes físicos (calor) ou preparações de membranas (LAURICHESSE et al., 2007; MARTINEZ et al., 2004; RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2004).

A imunização com essas vacinas possui diversos efeitos adversos, como dor no local da aplicação, náuseas e febre. Além disso, a resposta imune para essa vacina é majoritariamente direcionada aos LPSs, os quais estão presentes em abundância na membrana da bactéria. Deste modo, não fornecem proteção cruzada entre sorovares diferentes da preparação, uma vez que são os LPSs que definem os determinantes antigênicos de cada sorovar. Sendo assim, não induzem uma resposta de memória, necessitando de revacinação a cada 6-12 meses, (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1997; HAAKE, 2000; LEVETT, 2001; SETTE; RAPPUOLI, 2010).

O sequenciamento da espiroqueta *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004ab), identificou mais de 200 genes codificadores. O laboratório de Genoma Funcional do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan iniciou em 2002 um projeto piloto funcional bastante ambicioso no qual mais de 200 proteínas de *Leptospira* foram identificadas e avaliadas quanto à possibilidade de serem bons candidatos vacinais, sendo que 16 deles mostraram-se promissores (GAMBERINI et al., 2005). O critério empregado para a seleção destes genes foi à predição *in silico* da localização celular das proteínas, pois proteínas de membrana externa estão em contato com o hospedeiro e o ambiente e, portanto, são alvos potenciais para induzir a resposta imune. Estas proteínas também podem mediar o processo de adesão da bactéria às células do hospedeiro (CULLEN et al., 2002; HAAKE et al., 1999). A primeira vacina recombinante testada contra a leptospirose foi composta da lipoproteína de superfície LipL41 e uma porina transmembrana OmpL1; essas proteínas recombinantes foram utilizadas com frações de membrana de *E. coli* na imunização de hamsters. As duas foram capazes de induzir uma resposta protetora superior a 70% aos animais após o desafio, sugerindo um efeito sinérgico entre as mesmas (HAAKE et al., 1999). Seguindo a mesma estratégia, superfamília de proteínas do tipo imunoglobulinas, quando testadas foram capazes de conferir 90% proteção (LigA e LigB), utilizando o adjuvante de Freund. No entanto, foi observado que, embora essas proteínas fossem capazes de conferir certo grau de proteção, uma imunidade

esterilizante não foi alcançada, visto que leptospiros foram recuperadas de animais sobreviventes (HAAKE et al., 1999; KOIZUMI; WATANABE, 2004).

RISTOW et al. (2007), descreveu a proteína Loa22 como primeiro fator de virulência a ser descrito em *Leptospira* spp., foi a primeira lipoproteína contendo um domínio OmpA. Essas proteínas são caracterizadas por serem reconhecidas fortemente por soros de pacientes com leptospirose humana. Testes realizados com a Loa22, não apresentou uma proteção significativa em hamsters (33-50%). Além disso, essa proteção não foi considerada esterilizante (GAMBERINI et al., 2005; RISTOW et al., 2007; YAN et al., 2009, 2010). Outra proteína estudada foi a Lsa66, embora a eficácia protetora da Lsa66 tenha sido muito inferior ao que se esperava dados da literatura sugerem que proteínas contendo o domínio OmpA, são fortes candidatos para o desenvolvimento de uma vacina (ATZINGEN et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011).

A primeira vacina administrada com DNA foi correspondente a proteína LipL32 que é uma proteína imunodominante, já foi testada em diversas abordagens. E recentemente o DNA do gene codificador para a proteína LipL45, que se mostrou altamente imunogênica e capaz de desencadear uma resposta imune humoral e celular (VIJAYACHARI et al., 2015). No entanto, nenhum nível aceitável de proteção esterelizante foi obtido em nenhuma das estratégias utilizadas até a presente data.

1.7 Patogenicidade e fatores de virulência

Os mecanismos moleculares da patogênese da leptospirose ainda são pouco compreendidos, apenas alguns fatores de virulência que contribuem para patogênese da doença foram identificados. Uma série de componentes como o LPS (que já é sabido ser um fator de virulência em diversas bactérias Gram-negativas), hemolisinas, proteínas de membrana externa (OMPs) e moléculas de adesão, que já foram descritas para a interação entre o patógeno e a matriz extracelular (MEC), pode desempenhar um papel central na colonização do hospedeiro (BARBOSA et al., 2006; DOMINGOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2013).

Já foi demonstrada a capacidade de espiroquetas aderirem a células eucarióticas, moléculas da (MEC) e componentes do plasma do hospedeiro e têm sido sugeridas como características que contribuem de forma significativa para a virulência de vários agentes patogênicos, facilitando a disseminação inicial dentro dos hospedeiros (LÄHTEENMÄKI et al., 2001). A colonização e invasão dos tecidos de hospedeiros são passos importantes para o início

da infecção. As proteínas de superfície são o primeiro contato do patógeno com o hospedeiro e, portanto, apresentam potencial para mediar o processo de adesão da bactéria às células do hospedeiro. O estudo de proteínas associadas à membrana externa, através de métodos moleculares e bioquímicos convencionais, tem ajudado a compreender a patogênese da infecção (LIU et al., 2007).

Nosso grupo estabeleceu a capacidade de *Leptospira* spp. se ligar ao plasminogênio com diversos receptores presentes em sua superfície. Quando ligado, o plasminogênio pode ser convertido em plasmina (forma ativa) na superfície da bactéria. É importante destacar que *L. interrogans* virulentas, quando recobertas por plasmina, são capazes de degradar fibronectina e laminina, além de C3b e IgG, o que pode contribuir para a invasividade das leptospiros (VIEIRA et al., 2009, 2011).

Leptospiras patogênicas, mas não as saprofíticas, são resistentes à ação bactericida do soro humano. Essa resistência foi inicialmente atribuída a sua capacidade de se ligar ao fator H, pois quando o mesmo está ligado à superfície das leptospiros, permanece ativo funcionalmente, atuando como cofator na clivagem de C3b pelo fator I (MERI et al., 2005; VERMA et al., 2006).

Alguns anos mais tarde foram verificados que a *Leptospira* também se liga ao C4BP (C4 binding protein), que atua como um inibidor da via clássica e das lectinas do sistema complemento. Enquanto ligado a leptospira, o C4BP mantém sua atividade como cofator na clivagem do C4b mediada pelo fator I. No entanto, cepas atenuadas em cultura mantêm sua característica de ligação ao fator H e C4BP (BARBOSA et al., 2009; DOMINGOS et al., 2012; MERI et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2011).

A função da inflamação no hospedeiro é o de eliminar os agentes patogênicos microbianos. No entanto, a produção excessiva de agentes pró-inflamatórios pode causar também doenças inflamatórias patológicas e lesão de tecidos do hospedeiro, os sintomas inflamatórios graves, ocorrem em grande parte dos pacientes diagnosticados com leptospirose (BHARTI, 2003; LEVETT, 2001).

Já está estabelecido na literatura que, algumas hemolisinas de *L. interrogans* (Sph1, Sph2, Sph3, HlpA e TylA), são secretadas e possuem atividade hemolítica em eritrócitos de ovelhas, e induzem resposta inflamatória por meio de secreção de citocinas. As hemolisinas possuem a capacidade de romper às membranas dos eritrócitos e provocar a lise celular, e desta forma, liberam o ferro que é um componente indispensável para a sobrevivência das bactérias no hospedeiro, (FAINE, 1999; WANG et al., 2012). Estudos têm demonstrado que as citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12, podem estar envolvidas nas respostas inflamatórias durante o

processo infeccioso de *Leptospira*, enquanto as TNF- α e IL-6, são associadas com casos severos e mortalidade por leptospirose (DE FOST et al., 2003; VERNEL-PAUILLAC et al., 2010).

No genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, foram identificadas possíveis proteínas hipotéticas de membrana externa que podem estar relacionadas na patogênese da bactéria (NASCIMENTO et al., 2004ab). Nosso grupo já identificou a ligação direta de proteínas recombinantes de *L. interrogans* com componentes da MEC e plasma humano, indicando a existência de várias moléculas de adesão, como pode ser observado na tabela 1. As investigações destas proteínas forneceram um maior entendimento da patogenicidade da bactéria e possibilitaram a identificação de alguns fatores de virulência e possibilita o maior entendimento da patogênese e o desenvolvimento de novos candidatos vacinais.

LIC*	Nomeação	Ligantes	KD (nM)	Efeito do Metaperiodato	Efeito do ACA	Geração de Plasmina	Ref
LIC13479	Lsa46	Laminina	24,3±17	Não	-	-	Teixeira et al., 2015
		Plasminogênio	26,2±11,7	-	Sim	Sim	
		Fibronectina	ND	-	-	-	
		Plasmática					
LIC10050	Lsa77	Laminina	53±17,5	Não	-	-	Teixeira et al., 2015
		Plasminogênio	ND	-	Sim	Sim	
		Fibronectina	ND	-	-	-	
		Plasmática					
LIC10537	Frag 2	Plasminogênio	ND	-	Sim	Sim	Teixeira et al., 2016
LIC12906	Lsa24/LenA	Laminina	ND	Sim	-	-	Barbosa et al., 2006
		Plasminogênio	ND	-	Sim	Sim	Verma et al., 2010
LIC12690	Lp95	Laminina	ND	ND	-	-	Atzingen et al., 2009
		Fibronectina	ND	ND	-	-	
LIC10368	Lsa21	Laminina	ND	Sim	-	-	Atzingen et al., 2008
		Colágeno IV	ND	-	-	-	
		Fibronectina	ND	-	-	-	
LIC10314	Lsa63	Laminina	ND	ND	-	-	Vieira et al., 2010
		Colágeno IV	ND	-	-	-	
LIC12099	LipL53	Laminina	ND	Sim	-	-	Oliveira et al., 2010
		Colágeno IV	ND	-	-	-	
		Fibronectina	ND	-	-	-	
LIC10258	Lsa66	Laminina	55±15	ND	-	-	Oliveira et al., 2011
		Fibronectina	290±11	-	-	-	
		Plasminogênio	68,8±25,2	-	ND	Sim	
LIC12880	Lp30	Plasminogênio	167,39±60	-	ND	Sim	Oliveira et al., 2011
LIC11087	Lsa30	Laminina	292±24	ND	-	-	Souza et al., 2012
		Fibronectina	157±35	-	-	-	
		Plasminogênio	ND	-	ND	Sim	
		C4BP	ND	-	ND	-	
LIC10973	OmpL1	Laminina	2099±871	Não	-	-	Fernandes et al., 2012
		Fibronectina	1239±506	-	-	-	
		Plasminogênio	368,63±12	-	Sim	Sim	
LIC11469	Lsa20	Laminina	1988±563	ND	-	-	Mendes et al., 2011
		Plasminogen	509,13±77,	-	ND	Sim	
LIC12253	Lsa25	Laminina	415±203	Sim	-	-	Domingos et al., 2011

		C4BP	ND	-	-	-	
LIC11834	Lsa33	Laminina	367±248	Não	-	-	Domingos et al, 2012
		C4BP	ND	-	-	-	
		Plasminogênio	23,53±4,66	-	-	Sim	
LIC11360	Lsa23	Laminina	25,1±4,1	ND	-	-	Siqueira et al., 2013
		Plasminogênio	11,7±1,4	-	Sim	Sim	
		Fibronectina	528,7±143,	-	-	-	
		Fator H	ND	-	-	-	
		C4BP	17,6±3,5	-	-	-	
LIC11009	Lsa26	Laminina	952,2±418,	ND	-	-	Siqueira et al., 2013
		Plasminogênio	6,4±2,5	-	Sim	Sim	
LIC11975	Lsa36	Laminina	1208±97,6	ND	-	-	Siqueira et al., 2013
		Plasminogênio	17,8±5,5	-	Sim	Sim	
		Fibronectina	34,8±10,4	-	-	-	
LIC10645	Lsa44	Laminina	108,21±43	ND	-	-	Fernandes et al, 2014
		Plasminogênio	53,56±18,4	-	Sim	Sim	
LIC10731	Lsa45	Laminina	250,38	ND	-	-	Fernandes et al, 2014
		Plasminogênio	36,80±20,3	-	Sim	Sim	
LIC10829	Lsa32	Laminina	ND	ND	-	-	Domingos et al, 2015
		Plasminogen	81,57±31,1	-	Sim	Sim	
LIC10821	Lsa37	Laminina	ND	-	-	-	Silva et al, 2016
		Plasminogênio	110±224,2	-	Sim	Sim	
		Fibrinogênio	ND	-	-	-	
LIC10507		Plasminogênio	54,4±30,5	-	sim	sim	Siqueira et al, 2016
LIC10508		Plasminogênio	38,3±50,1	-	sim	sim	Siqueira et al, 2016
		Fibronectina	ND	-	-	-	
		C4BP	ND	-	-	-	
LIC11122	Lsa19	Laminina	812±372	sim	-	-	
		Plasminogênio	1465±1051	-	sim	sim	#
LIC12287	Lsa14	Laminina	51,7±44	não	-	-	#
		Plasminogênio	83,1±27,69	-	sim	sim	#
							#

Tabela 1 - Análise comparativa de proteínas estudadas pelo grupo. NOTAS: Gene LIC: *L. interrogans* sorovar Copenhageni – LIC (NASCIMENTO et al., 2004a; NASCIMENTO et al., 2004b). ND= não determinado;
 # proteínas recombinates do estudo LIC11122 e LIC12287,
 K_D = constante de dissociação
 Fonte: Modificado de (TEIXEIRA et al., 2015).

2 OBJETIVO

O objetivo geral do presente trabalho é a clonagem e expressão de genes que codificam para proteínas sem funções conhecidas, localizados na superfície e identificados na sequência do genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni e sua caracterização quanto a possíveis atuações nos processos de invasão e evasão imune do hospedeiro.

2.1 Objetivos específicos

- Analisar os genes selecionados *in silico* quanto às predições de localização das sequências codificadoras.
- Obter as proteínas recombinantes correspondentes às sequências selecionadas.
- Confirmar a localização celular por meio de ensaios *in vitro*.
- Avaliar a interação *in vitro* dos recombinantes com componentes da MEC e do soro humano.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Na sequência serão abordadas metodologias empregadas para o desenvolvimento do trabalho.

3.1 Cepas bacterianas *Leptospira* spp.

A cepa não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1, a cepa patogênica com virulência atenuada *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M-20, e as cepas patogênicas virulentas *L. interrogans* sorovares Kennewicki cepa Pomona Fromm- LPF e Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, foram utilizadas neste trabalho.

As bactérias foram cultivadas a 28 °C em meio líquido Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris (EMHJ), contendo 10% de soro de coelho e enriquecido com *L*-asparagina (0,015% m/v), piruvato de sódio (0,001% m/v), cloreto de cálcio (0,001% m/v), cloreto de magnésio (0,001% m/v), peptona (0,03% m/v) e extrato de carne (0,02% m/v) (TURNER, 1970). Como o tempo de geração das leptopiras é de 6 a 8 horas, as subculturas são mantidas de 7-14 dias antes de serem subcultivadas. A recuperação da virulência é realizada em hamsters e o cultivo obtido a partir do isolamento primário é mantido por até 13 semanas. As culturas e os hamsters infectados para a obtenção das cepas virulentas foram mantidos na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, SP, Brasil.

3.2 *Escherichia coli*

Bactérias da linhagem *Escherichia coli* DH5 α TM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foram utilizadas para subclonagem dos produtos amplificados por PCR (*amplicons*) no vetor pGEM-T Easy (Promega, Prodimol, MG, Brasil) e clonagem no vetor de expressão pAE (RAMOS et al., 2004).

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

As linhagens utilizadas para a expressão apresentam as seguintes características: BL21-SI possui o gene da T7 RNA polimerase integrado ao genoma sob controle do promotor *proU* e por isso a expressão do gene é induzida por NaCl (DAVANLOO et al., 1984). BL21(DE3) também possui o gene da T7 RNA polimerase, no entanto, a expressão é controlada pelo promotor *lac UV5*, o qual é induzido por IPTG (STUDIER et al., 1990). BL21Star (DE3)pLysS possui um plasmídeo pLysS que expressa uma enzima capaz de degradar a RNA

polimerase T7, impedindo a expressão da proteína em níveis basais na ausência de indutores, Davanloo et al. (1984), e por fim a linhagem C43(DE3) apresenta uma mutação que previne a morte celular, e por isso, são indicadas para expressão de proteínas tóxicas (MIROUX; WALKER, 1996).

3.3 Soros

Os 20 soros pareados de humanos infectados com *Leptospira* spp. utilizados no presente trabalho pertencem a uma soroteca do Instituto Adolfo Lutz e foram gentilmente cedidos pela Doutora Eliete C. Romero para fins de pesquisa. Para ser considerado MAT+ (fase convalescente) a amostra deve apresentar um título 4x maior que seu soro pareado, MAT – (fase inicial), que é considerado por um título de aglutinação menor que 100.

São utilizados como antígenos os sorovares: Australis, Autumnalis, Bataviae, Canicola, Castellonis, Celledoni, Copenhageni, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Sejroe e Shermani. Todas as cepas são mantidas em meio EMJH.

3.4 Extração do DNA genômico da *Leptospira interrogans*

Foi extraído o material genético da bactéria *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M-20 (atenuada por passagens em cultura). Para tal, foram coletados 1,5 mL da cultura de leptospiros em microtubo, e então este foi centrifugado por 2 minutos a 10.000 x g a temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi repetido para outros 1,5 mL. O sedimento formado após a centrifugação foi ressuspenso em 467 µL de tampão Tris-EDTA (TE), sendo então adicionados 30 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 3 µL de 20 mg/mL de proteinase K (Sigam-Aldrich, St. Louis, Mo., EUA). A mistura foi homogeneizada e incubada por 1 hora a 37 °C. Foi adicionado igual volume de uma solução fenol-clorofórmio (1:1), sendo então a mistura agitada até as fases se misturarem completamente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos, e então o sobrenadante foi recuperado. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a esta foi adicionado igual volume de fenol-clorofórmio (1:1). Novamente as amostras foram agitadas, centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos, e o sobrenadante foi coletado. Ao sobrenadante recuperado foi adicionado 1/10 volume de acetato de sódio 3 M e 0,642 volume de isopropanol. A solução foi homogeneizada e acondicionada em freezer -20 °C por 1 hora. Após centrifugação, o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado, sendo subsequentemente centrifugado a 8.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O etanol foi

desprezado e 50 μ L de tampão TE foram adicionados para eluição do DNA. A concentração e qualidade do DNA genômico foram determinadas por leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

3.5 Vetores de clonagem e expressão

O vetor pGEM-T Easy (Promega, Prodimol, MG, Brasil, 2010) (Figura 3), apresenta promotores T7 e SP6, um gene de resistência a ampicilina e um sítio de múltipla clonagem que interrompe a região codificadora do peptídeo- α da enzima β -galactosidase, e essa interrupção da expressão desse peptídeo permite a seleção dos clones recombinantes em placas de cultura contendo IPTG (isopropil- β -tiogalactotopiranosídeo) e X-Gal pela coloração azul/branco.

Figura 3 - Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy. 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)

Fonte: (PROMEGA, 2016).

O vetor pAE Ramos et al. (2004) foi desenvolvido para expressar a proteína recombinante contendo uma sequência codificadora para 6 resíduos de histidina na região N-terminal. Este vetor possui códon ATG de início de transcrição, gene de resistência a ampicilina e sinal de terminação de transcrição (Figura 4). É um sistema de alta expressão que é controlado pelo promotor do fago T7, permitindo que a expressão da proteína recombinante só ocorra na presença da T7 RNA polimerase. Os clones supostamente positivos foram selecionados por ensaio com enzimas de restrição e sequenciados pelo método de terminação de cadeia (Sanger) para a confirmação.

Figura 4 - Mapa do vetor de expressão pAE. Mapa do vetor de expressão pAE. P_{T7}: promotor. (HIS)_{6x}: sequência codificadora para seis resíduos de histidina. RBS: sítio de ligação ao ribossomo. ATG: códon de início da transcrição. Term: região de terminação de transcrição F1 ori: origem de replicação. Amp^R: gene de resistência à ampicilina. Fonte: (RAMOS et al., 2004).

3.6 Análises *in silico* das sequências codificadoras (CDS)

As sequências codificadoras preditas (CDS) foram selecionadas do genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni disponível no banco de dados público *Leptospira - Genome Project* (2001) com base Nascimento et al. (2004ab), principalmente, na sua localização celular predita pelos programas: *Program for Detecting the Sorting Signals of Proteins* (PSORT) (NAKAI; KANEHISA, 1991; NAKAI; HORTON, 1999) e *Subcellular Localization predictor* (CELLO) (YU et al., 2006). Para predição de domínios estruturais e funcionais nas sequências de aminoácidos foram utilizados os programas *Simple Modular Architecture Research Tool* (SMART) (FINN et al., 2006), e *protein familie* PFAM (GASTEIGER, 2006). Os programas *prediction of lipoproteins* (LipoP) (JUNCKER et al., 2003; LETUNIC et al., 2014) e *signal peptides* (SignalP) (BENDTSEN et al., 2004; NIELSEN et al., 1997) foram utilizados para avaliar a presença do sítio e lipidação ou clivagem.

A análise da similaridade das sequências estudadas com as de outras espécies e sorovares de *Leptospira* foi realizada pela ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool*, 2014 (BLAST), (ALTSCHUL et al., 1990, 1997).

O programa ClustalW2 Larkin et al. (2007) foi utilizado para alinhar sequências de diferentes sorovares de *Leptospira* e assim gerar um filograma. As características físicas e

químicas das proteínas preditas codificadas pelos genes em estudos foram avaliadas utilizando a ferramenta ProtParam (WIEDEMANN; BELLSTEDT; GORLACH, 2013).

3.7 Amplificação dos genes por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para obtenção de produtos de PCR e possibilidade de amplificar os genes de interesse foram desenhados oligonucleotídeos (*Forward* e *Reverse*) com o auxílio do programa GeneRunner® (1994). As sequências de primers correspondentes a cada gene e seus respectivos sítios de restrição podem ser visualizadas no Quadro 1.

A amplificação dos genes foi realizada por PCR utilizando os seguintes reagentes: PCR buffer; 0,25 mM dNTPs; 2 mM MgCl₂; 0,5 mM de cada oligonucleotídeo (*F* e *R*); 1 U Taq polimerase; 100 ng de DNA genômico. A princípio, as temperaturas de anelamento visualizadas no quadro 1 foram determinadas de acordo com o programa GeneRunner® (1994).

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA) e corado com Gel Red™ (Biotium, Inc., Hayward, CA, EUA).

Gene ID	Oligonucleotídeo “Forward”	Oligonucleotídeo “Reverse”	TA	Amplicon
LIC10377	F:5' CTCGAG GTAATGTTGGTGT TTTTGATCG3' (<i>XhoI</i>)	R:5' AAGCTT TTAATGAAGTTTAGT TGTACTTTTATACTT3' (<i>HindIII</i>)	56 °C	750 pb
LIC11122	F:5' CTCGAG CCTAAGACCGCCG AAAGTTCAG3' (<i>XhoI</i>)	R:5' GGTACCT CATTTCATTTGGTC AATCTGCTC3' (<i>KpnI</i>)	45 °C	576 pb
LIC11184	F:5' CTCGAG TGAAGATGAAAA AAGGA3' (<i>XhoI</i>)	R:5' AAGCTT TTAGTAACCACACTC ACTCGC3' (<i>HindIII</i>)	54 °C	660 pb
LIC12287	F:5' CTCGAG TACATTTACGGACT TCGCCC3' (<i>XhoI</i>)	R:5' AAGCTT TTATTTTCTTTCCG GTAGCA3' (<i>HindIII</i>)	59 °C	406 pb

Quadro 1 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes por PCR. Gene ID- identificação do gene no genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni (LIC). TA - temperatura de anelamento. pb - pares de base. Abreviaturas em inglês: F-Forward, R-Reverse. As letras sublinhadas e de cores diferentes correspondem as sequências de enzimas de restrição: *XhoI* (preto), *KpnI* (azul) e *HindIII* (verde).

3.8 Clonagem e Expressão das proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

Os *amplicons* foram cuidadosamente recortados do gel e purificados utilizando o kit “GFxPCR DNA and gel band purification” (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, EUA). Os produtos purificados foram quantificados e inseridos no vetor de clonagem pGEM-T Easy (Figura 3). Os clones supostamente positivos (colônias brancas) foram submetidos ao ensaio com enzimas de restrição e sequenciados pelo método de terminação de

cadeia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1997) para a confirmação da presença do inserto no vetor. Os insertos de DNA foram removidos do vetor pGEM-T easy pela ação das enzimas de restrição (Quadro 1) e ligados ao vetor de expressão pAE (Figura 4) (RAMOS et al., 2004), previamente digerido com as mesmas enzimas. Como pode ser visualizado do quadro 1, as enzimas utilizadas foram *XhoI* (CTCGAG) com sua sequência representada em negrito e sublinhada, *KpnI* (GGTACC), com a sequência representada em azul e sublinhada, e *HindIII* (AAGCTT), representada pela cor verde e sublinhada.

A ligação dos insertos ao vetor pAE foi realizada em uma reação contendo inserto: vetor em uma proporção 5:1. Deixou-se o inserto e o vetor em contato por 5 minutos a uma temperatura de 45 °C e depois incubamos em banho de gelo por 5 minutos; em seguida foi adicionada a T4 DNA ligase (GE Healthcare) e a reação foi incubada por 16 horas a 16 °C. Foi realizada em paralelo uma reação de controle negativo omitindo o inserto.

Cada construção foi inserida por transformação por choque térmico em *Escherichia coli* DH5 α TM tornadas previamente competentes (HANAHAHAN, 1983). As bactérias transformadas foram semeadas em placas contendo meio Luria-Bertani (LB) sólido e ampicilina (100 μ g/mL) e incubadas a temperatura de 37 °C por 16 horas. As colônias resistentes foram selecionadas e inoculadas em 4 mL de meio de cultura contendo ampicilina. A incubação procedeu à temperatura de 37 °C, por aproximadamente 16 horas.

A seleção dos clones positivos foi avaliada por extração plasmidial rápida com fenol: clorofórmio 1:1. Foram centrifugados 300 μ L de cada inóculo a 11.300 $\times$ g, por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 50 μ L de água deionizada. Foi adicionado à amostra 20 μ L de Ficoll dye 10X contendo GelRedTM (Biotium) e 28 μ L de solução fenol: clorofórmio 1:1. Homogeneizou-se a amostra e centrifugou-se a 11.3000 $\times$ g por 3 minutos. Fase superior foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%. Foi realizado ensaio de restrição e sequenciamento automático das amostras de interesse para confirmação da presença do inserto. O sequenciamento por terminação em cadeia, o qual consiste em uma técnica que utiliza moléculas sintéticas de ddNTPs semelhantes dNTPs. Essas moléculas são marcadas por fluoróforos que, quando excitados por um laser, emitem um espectro singular, que é detectado por um programa de computador e gera um cromatograma com as sequências de nucleótidos (GLICK et al., 2010; SANGER; NICKLEN; COULSON, 1997).

Os plasmídeos pAE-LIC10377, pAE-LIC11122 e pAE-LIC12287 foram utilizados para transformar diferentes cepas de *E. coli* que foram cultivadas em meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL) e cloranfenicol (100 μ g/mL), este último apenas quando presente o plasmídeo pLysS. A cepa *E. coli* BL21-SI foi cultivada em meio 2x Yeast-Tryptone

sem adição de NaCl (2YT/ON) (Sigma-Aldrich) e com adição de ampicilina (100 µg/mL). Após transformação, as bactérias foram cultivadas por 16 horas a 37 °C ou 30 °C, no caso da cepa BL21-SI, diluídas em meio fresco, e cultivadas novamente até atingirem a densidade ótica de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}).

A síntese de proteína foi induzida por adição de 0,01 mM, 0,1 mM e 1 mM de Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Sigma), exceto para a cepa *E. coli* BL21-SI, que foram utilizadas concentrações de 75 mM, 150 mM e 300 mM de NaCl. Após 3 horas de indução, as bactérias foram centrifugadas a $4.628 \times g$ por 10 minutos em temperatura ambiente; o sedimento bacteriano foi ressuspenso em tampão de lise (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM de NaCl, 200 µg/mL de lisozima, 1% triton X-100, 2 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF)). A suspensão bacteriana foi lisada em gelo utilizando-se o sonicador Branson, Digital Sonifier, a 60% de intensidade por 5 minutos. As frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação a $12.857 \times g$, por 10 minutos a 4 °C. Alíquotas do sobrenadante e do sedimento solubilizado em tampão de desnaturação com (10mM Tris/HCl, pH 8.0, 8 M uréia), foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE 15%

3.9 Purificação e diálise das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade ao metal. A purificação foi realizada a partir de 100 mL de cultura de *E. coli* BL21-SI e *E. coli* BL21 Star (DE3)pLysS, para as proteínas recombinantes rLIC11122 e rLIC12287, respectivamente. As proteínas expressas em corpúsculo de inclusão foram desnaturadas com 50 mL de tampão de desnaturação contendo 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 8M uréia. A purificação da proteína rLIC12287 foi realizada utilizando o método de *refolding* na coluna, no qual a proteína recombinante é adsorvida à coluna em sua forma desnaturada, e então soluções contendo concentrações decrescentes de ureia são passadas na coluna a fim de promover a renaturação da proteína. Assim, a resina “Chelating Sepharose” (GE Healthcare) previamente carregada com Ni^{2+} foi equilibrada com tampão de desnaturação e carregada com 50 mL da amostra. Em seguida, tampões contendo concentrações decrescentes de ureia (6 M, 4 M, 2 M, 1 M) foram passadas na coluna. Após quatro lavagens com tampões contendo concentrações crescentes de imidazol (5 mM, 20 mM, 40 mM e 60 mM) a proteína foi eluída com a concentração final de 1M de imidazol. A rLIC11122, expressa na forma solúvel, foi purificada sem necessidade do tampão desnaturação com 8M ureia. As frações de eluição obtidas foram coletadas e analisadas em gel de SDS-PAGE.

As proteínas recombinantes foram dialisadas em tampões 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM de NaCl e 0,1% de glicina, por cerca de 4 horas, sob agitação, 4 °C. Foram realizadas duas trocas, antes do tampão final contendo PBS e 0,1% de glicina. Alíquotas foram armazenadas a -20 °C. A concentração das proteínas recombinantes foi estimada em SDS-PAGE, por da comparação com concentrações pré-estabelecidas de albumina sérica bovina (BSA – *Bovine Serum Albumin*), utilizando análise densitométrica do software GelQuant (2003).

3.10 Espectroscopia circular (CD)

As amostras de proteínas foram dialisadas em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4, apropriado para análise por não conter íons cloro e assim não interferirem nas leituras das amostras (Johnson, 1990). As medições de espectroscopia circular foram feitas a temperatura ambiente em um espectropolarímetro Jasco J-810 (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan). O espectro foi medido usando uma célula de 1 mm, e foi apresentado uma média de 5 leituras. Os espectros foram expressos em termos de elipticidade molar residual:

$$[\Phi] = \Phi \text{ (mdeg)} \times 10 \times M \text{ (Da)} \times C \text{ (mg/mL)} \times I \text{ (cm)} \times N,$$

onde Φ é a elipticidade, M é a massa molecular da proteína, C é a concentração da proteína, I é o caminho óptico e N é o número de resíduos de aminoácidos das proteínas (DUNCAN *et al.*, 2005; KELLY *et al.*, 2005; WATT *et al.*, 2005).

Os valores de elipticidade molar residual foram utilizados para o cálculo da porcentagem de estruturas secundárias utilizando o software CAPITO (WIEDEMANN *et al.*, 2013).

3.11 Detecção de anticorpos IgG em soros de humanos diagnosticados com leptospirose e hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira*

Para a detecção de anticorpos IgG anti- rLIC11122 e anti- rLIC12287, em uma placa de ELISA foram imobilizados 250 ng de proteína recombinante por poço e incubados por 16 horas a 4 °C. Após a incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T (PBS + 0,05% Tween 20). A placa foi bloqueada utilizando solução 10% leite diluído em PBS-T por 2 horas a 37 °C. Após o descarte do bloqueio, foram adicionados os 20 soros pareados de humanos diagnosticados com leptospirose (MAT–; fase inicial e MAT+; fase convalescente), previamente adsorvidos em 25% extrato de *E. coli* diluição 1:200. Após 2 horas de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e então foi adicionado o anticorpo anti-IgG humano conjugado a peroxidase na diluição 1:5000 e incubado por 1 hora. Após a incubação, a placa foi lavada e a reatividade revelada utilizando 1 mg/mL de OPD diluído em tampão citrato-fosfato pH 5,0

contendo 0,1 % (vol/vol) de peróxido de hidrogênio (100 µL/poço). Após 15 minutos de incubação no escuro, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de solução 4N de H₂SO₄.

A DO foi determinada em leitor de microplacas (Multiskan- FC, Thermo Fisher Scientific, Helsinki, Finlândia) usando o comprimento de onda de 492 nm. Para a determinação da frequência de soros reativos para as proteínas, foi utilizado como limiar o valor de corte (*cutoff value*), o qual foi baseado na média da densidade óptica obtido para dois *pools* comerciais (Sigma-Aldrich e Complement Technology, INC. Tyler, TX, EUA) de soros de indivíduos saudáveis, somados a três vezes o desvio padrão. A reatividade de cada soro foi realizada em duplicata, e os valores finais expressos correspondem à média dos valores de densidade ótica.

Para o ensaio realizado com soros de hamsters 44 foram imobilizados 250 ng de proteína recombinante por poço e incubados por 16 horas a 4 °C. Após a incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T (PBS + 0,05% Tween 20). A placa foi bloqueada utilizando solução 10% leite diluído em PBS-T por 2 horas a 37 °C. Foram adicionados os 44 soros MAT+. Após 2 horas de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e então foi adicionado o anticorpo anti-mouse humano conjugado a peroxidase na diluição 1:5000 e incubado por 1 hora. E a revelação foi realizada como descrita no ensaio acima.

Para a determinação do valor de corte, para o ensaio com soros de hamsters infectados, utilizou-se a média da densidade óptica obtido 4 soros de animais saudáveis, somados a três vezes o desvio padrão.

3.12 Produção de antissoros policlonais em camundongos

Para a produção de antissoro policlonal contra as proteínas recombinantes, fêmeas de camundongos BALB/c (4 a 6 semanas de idade) foram imunizadas pela via subcutânea com 10 µg de cada proteína recombinante em volume final de 300 µL para cada animal. As proteínas recombinantes foram adsorvidas em uma solução 12,5% (v/v) de Alhydrogel (2% Al(OH)₃; Brenntag Biosector, Frederikssund, Dianamarca), usado como adjuvante. Foram realizados 2 reforços subsequentes em intervalos de 15 dias utilizando a mesma preparação descrita anteriormente. Para o grupo controle, foi administrada solução PBS contendo o adjuvante. Os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital 15 dias após cada imunização, e *pools* dos soros foram analisados quanto aos títulos de IgG por ELISA.

Para realizar a titulação, em uma placa de ELISA foram imobilizados 250 ng de proteína recombinante por poço e incubados por 16 horas a 4 °C. Após a incubação a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T. A placa foi bloqueada utilizando 10% leite desnatado diluído em

PBS-T por 2 horas a 37 °C. Após o descarte do bloqueio foram utilizados os *pools* de soro dos animais como anticorpo primário, numa diluição de 1:200, e então foi realizada uma diluição seriada até 1:204800. Após 2 horas de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e então incubada o anticorpo anti-IgG camundongo conjugado a peroxidase e incubada por 1 hora. Após incubação, a placa foi lavada e a reatividade revelada utilizando-se 1 mg/mL de OPD diluído tampão citrato-fosfato em pH 5,0 contendo 0,1 % (vol/vol) de peróxido de hidrogênio (100 µL/por poço). Após 15 minutos de incubação no escuro, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de solução de H₂SO₄ 4 N.

A DO foi determinada em leitor de microplacas (Multiskan EX) usando o comprimento de onda de 492 nm. O título individual foi determinado como sendo o quociente da maior diluição do soro com valor da DO a 492 nm igual a 0,1.

3.13 Avaliação *in vitro* dos efeitos das proteínas recombinantes sobre esplenócitos de camundongos

Camundongos BALB/c imunizados com as proteínas recombinantes foram eutanasiados, após 15 dias da última imunização e seus baços foram assepticamente removidos e depositados em meio RPMI (Roswell 15 Park Memorial Institute Medium-RPMI-1640 contendo 2 mM *L*-glutamina, 100 IU/mL de Penicilina, 100 µg/mL de Streptomicina). Os baços foram macerados e centrifugados a 150 *x g*, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e à fase sedimentada foi adicionado 1 mL de água gelada estéril, para lise dos eritrócitos. Após este procedimento, as suspensões foram novamente centrifugadas. O sobrenadante resultante foi descartado e os esplenócitos foram ressuspensos em 1 mL de RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (inativado por 20 minutos a 60 °C). As células foram avaliadas quanto à sua viabilidade e contadas após marcação com 0,4% azul de tripan e em seguida distribuídas em triplicata em uma placa de cultura celular de 96 poços (Costar, Corning), na quantidade de 5x10⁶ células/poço.

Os esplenócitos foram estimulados com 5 µg/mL do mitógeno Concanavalina A (ConA) (Sigma-Aldrich), empregado como controle positivo de proliferação, 5µg/mL de cada proteína recombinante ou não foram estimulados (apenas meio), sendo este tratamento empregado como controle negativo de proliferação. A cultura destas células foi mantida por 48 h a 37 °C e 5% CO₂, em atmosfera umidificada. A taxa de proliferação celular foi determinada em função da replicação do DNA, medida pela incorporação de bromodesoxiuridina (BrdU), um análogo a base nitrogenada timina, utilizando o kit *Cell Proliferation* ELISA, BrdU (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN). As células foram incubadas por 2h com BrdU para permitir a

marcação do DNA genômico. Em seguida, anticorpo anti-BrdU conjugado com peroxidase (1:100) foi adicionado e as células foram incubadas por 90 minutos. A solução de substrato para a enzima foi adicionada e foi feita incubação à temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida, a reação enzimática foi parada pela adição de 1 M de H_2SO_4 e a densidade ótica foi medida a 405 nm. O Índice de Estimulação (I.E) foi calculado como sendo o quociente entre a DO 405 nm média das células estimuladas com a proteína recombinante e a DO 405 nm média das células cultivadas apenas em meio, ou seja, sem estímulo, dentro do grupo dos animais imunizados.

3.14 Ensaios de immunoblotting

As proteínas recombinantes foram aplicadas em gel SDS-PAGE (15%) e foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL; GE Healthcare) em equipamento semi-seco (Thermo Fisher Scientific). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução PBS-T contendo 10% de leite em pó desnatado e incubada com antissoro policlonal anti- rLIC11122 ou anti- rLIC12287 na diluição de 1:3000, por 2 horas ou utilizando o anticorpo monoclonal antipoli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído 1:5000, por 1 hora a temperatura ambiente. Quando utilizados os antissoros policlonais produzidos em camundongos, a reação foi detectada por incubação, por 1 hora, com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase como anticorpo secundário, na diluição de 1:5000. A reatividade da peroxidases foi revelada utilizando o kit SuperSignal® West Dura (Thermo Fisher Scientific) e o fotodocumentador (GE Healthcare) (DNR Bio-Imaging Systems Ltd, 2003).

3.15 Ensaio de interação das proteínas recombinantes com componentes da matriz extracelular (MEC) e do plasma humano

Em uma microplaca de 96 poços foram imobilizados (1 µg/poço) laminina, colágeno tipo I, colágeno tipo IV, fibronectina celular e plasmática, elastina, plasminogênio (PLG), fator H, fibrinogênio, C4BP, BSA e fetuína (utilizados como controles negativos de interações) (Sigma-Aldrich) em 100 µL PBS por 16 horas a 4 °C. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T e então bloqueados com 200 µL de PBS-T contendo 10% (m/v) de leite em pó desnatado por 2 horas a 37 °C.

Em seguida, um micrograma de cada proteína recombinante em 100 µL de PBS foi adicionado, permitindo uma interação entre os componentes durante 2 horas a 37 °C. Após 6 lavagens com PBS-T, as proteínas ligadas foram detectadas adicionando o antissoro produzido contra cada proteína na diluição 1:2000, referente ao valor de DO_{492nm} igual a 1,0 nos

experimentos prévios de titulação. Em um ensaio paralelo foi utilizado o monoclonal anticorpo antipoli-histidina conjugado com peroxidase na diluição de 1:5000 para confirmação da ligação das proteínas recombinantes com os componentes. Após 3 lavagens com PBS-T, 100 µL do anticorpo contra IgG de camundongo produzido em coelho e conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:5000 em PBS foi adicionado em cada poço e incubado por 1 hora a 37 °C. Após a incubação, os poços foram lavados 3 vezes e a reação foi revelada com OPD e H₂O₂, como descrito anteriormente (seção 3.9)

As análises estatísticas foram feitas comparando os valores de DO da interação das proteínas recombinantes com macromoléculas em relação a sua interação com o BSA e fetuína, utilizando-se o teste *t-Student* bicaudal pareado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3.16 Curvas de dose-dependência da ligação das proteínas recombinantes com os componentes

Os componentes que mostraram interação significativa com as proteínas recombinantes foram imobilizados em microplaca de 96 poços, um micrograma por poço em 100 µL de PBS, durante 16 horas a 4 °C. Após 3 lavagens com PBS-T as placas foram bloqueadas com solução de PBS-T 10% leite e 1% BSA (m/v) por 2 horas a 37 °C. Após o bloqueio ser descartado, foram adicionadas concentrações crescentes das proteínas recombinantes rLIC11122 e rLIC12287: 0 a 19 µM e 0 a 5,5 µM para laminina, e 0 a 19 µM e 0 a 3,0 µM para plasminogênio, respectivamente. Foi avaliada a ligação entre a proteína recombinante e a macromolécula após 2 horas de incubação a 37 °C. Para a detecção da proteína recombinante foi utilizado o antissoro policlonal produzido em camundongos para cada proteína (anti- rLIC11122 e anti- rLIC12287) na diluição de 1:2000 e anticorpo anti- IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:5000 (Sigma Aldrich). A reação foi revelada como descrito anteriormente (seção 3.9).

Os valores de absorbância obtidos nas diferentes concentrações foram usados para o cálculo da constante de dissociação (K_D) de acordo com o método descrito por Lin *et al.* (2009), com base na equação $K_D = (A_{\max} [\text{proteína}]/A) - [\text{proteína}]$, na qual A é absorbância em uma determinada concentração da proteína ($[\text{proteína}]$), $A_{\max}$ é absorbância máxima obtida na saturação da ligação e o K_D a constante de dissociação do equilíbrio.

3.17 Inibição da interação das proteínas recombinantes com componentes após incubação com antissoro correspondente

Em microplaca foi imobilizado um micrograma por poço de laminina ou PLG em 100 μL de PBS, por 16 horas a 4 °C. A placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e então bloqueada com 200 μL de solução PBS-T contendo 10% leite em pó desnatado e 1% BSA (m/v). Separadamente, a proteína recombinante foi incubada com seu respectivo antissoro (1:50) e (1:100) por 2 horas a 37 °C. Neste experimento, como controle, as proteínas foram incubadas na ausência de antissoro ou com antissoro de animais inoculados com PBS (não imune). Em seguida, foi adicionado à placa, 1 μg de proteína recombinante tratada ou não tratada previamente com antissoro. A placa foi incubada por 2 horas a 37 °C, e após 3 lavagens com PBS-T, a ligação foi detectada utilizando o anticorpo monoclonal antipoli-histidina conjugado com peroxidase na diluição de 1:5000, após incubação, a placa foi lavada e a reatividade revelada utilizando-se 1 mg/mL de OPD diluído tampão citrato-fosfato em pH 5,0 contendo 0,1 % (vol/vol) de peróxido de hidrogênio (100 μL /por poço). Após 15 minutos de incubação no escuro, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μL de solução de H_2SO_4 4 N. A análise estatística foi feita comparando o percentual da ligação entre proteínas sem tratamento (100% de ligação) e proteínas tratadas com antissoro não imune ou com antissoro anti-recombinante, utilizando o teste *t-Student* bicaudal pareado, sendo considerado significativo o valor de $P < 0,05$.

3.18 Interação das proteínas recombinantes desnaturadas com componentes da (MEC e plasma humano

A avaliação da interação das proteínas recombinantes desnaturadas com componentes da MEC e do plasma foi realizada por ELISA, exatamente como descrito anteriormente (seção 3.14), porém antes de elas serem adicionadas à placa, elas foram aquecidas por 10 minutos a 96 °C. O BSA foi utilizado como controle negativo. Para análise estatística a interação das proteínas recombinantes aquecidas foi comparada com a interação das proteínas recombinantes que não foram previamente aquecidas utilizando o teste *t-Student* bicaudal pareado e foi considerado o valor de ($*P < 0,05$).

3.19 Efeitos do metaperiodato na ligação das proteínas recombinantes à laminina

Laminina foi diluída em tampão contendo 50 mM de acetato de sódio (pH 5,0) na concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$ e em seguida foi adicionada à placa de ELISA para sua imobilização. Após 16 horas, a laminina imobilizada foi tratada com diferentes concentrações de metaperiodato de sódio (0 a 100 mM) (Sigma- Aldrich) para que ocorresse a oxidação dos resíduos de açúcares da macromolécula. Após o tratamento, as proteínas recombinantes foram

adicionadas aos poços na concentração de 10 µg/mL em cada poço, por 1 e 30 minutos a 37 °C. Após 3 lavagens com PBS-T, a ligação foi detectada utilizando o anticorpo monoclonal antipoli-histidina conjugado com peroxidase na diluição de 1:5000, após incubação, a placa foi lavada e a reatividade revelada utilizando-se 1 mg/mL de OPD diluído tampão citrato-fosfato em pH 5,0 contendo 0,1 % (vol/vol) de peróxido de hidrogênio (100 µL/poço). Após 15 minutos de incubação no escuro, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de solução de H₂SO₄ 4 N.

Para as análises estatísticas, a média dos valores de absorbância obtida para a ligação das proteínas recombinantes à laminina oxidada foi comparada com a média dos valores de absorbância obtidos para a ligação das proteínas a laminina sem oxidação pelo teste *t-Student* e valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativo.

3.20 Caracterização da ligação da proteína recombinante com o PLG

Este ensaio foi realizado para determinar o papel dos resíduos de lisina das proteínas rLIC11122 e rLIC12287 com os domínios *kringle* do plasminogênio. Em uma placa de microdiluição foi adicionado 1 µg de PLG/poço e incubado por 16 horas a 4 °C. Após 3 lavagens com PBS-T, a placa foi bloqueada com solução PBS-T contendo 10% leite em pó desnatado e 1% BSA (m/v). Após o bloqueio, foi adicionado 1 µg de Lsa19 ou Lsa14 junto com diferentes concentrações de ácido aminocapróico (ACA; Sigma-Aldrich, entre 0 a 20 mM), um análogo de lisina. A detecção da interação da proteína recombinante foi detectada como descrito anteriormente (seção 3.16).

Para as análises estatísticas, teste *t-Student* foi utilizado para comparar a média dos valores de absorbância obtidos para as proteínas incubadas com ACA e a média dos valores de absorbância obtidos pela ligação das proteínas na situação onde não havia competidor.

3.21 Inibição da ligação do plasminogênio por NaCl

Em microplaca foi imobilizado um micrograma por poço de proteína recombinante Lsa19, Lsa14 ou BSA (controle negativo) em 100 µL de PBS, durante 16 horas a 4 °C. A placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e bloqueada por 2 horas a 37 °C com PBS-T contendo 10% (m/v) leite em pó desnatado. Após o bloqueio foi adicionado a placa de microdiluição 1 µg de PLG em tampão contendo diversas concentrações de cloreto de sódio (50, 100, 150, 200, 300, 550 mM), para observar o efeito da força iônica sobre a interação entre o PLG e as proteínas recombinantes, a incubação procedeu por 1 hora e 30 minutos. O controle empregado foi o plasminogênio apenas com o PBS (low salt), que apresenta uma concentração de 50 mM de

NaCl. Após 3 lavagens com PBS-T, a placa foi incubada durante 1 hora com anticorpo anti-plasminogénio (1: 5000) diluído em PBS1s. Após a incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e, em seguida, incubou-se anticorpo anti-IgG (1:5000) de camundongo conjugado com peroxidase.

Para as análises estatísticas, a média dos valores de absorbância obtida para a ligação das proteínas recombinantes com o PLG nas diversas concentrações de NaCl foi comparada com a média dos valores de absorbância obtidos para a ligação das proteínas ao PLG na concentração de 50 mM de NaCl pelo teste *t-Student* e valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativo.

3.22 Ensaio de atividade enzimática da plasmina

Em microplaca foi imobilizado um micrograma por poço de proteína recombinante Lsa19, Lsa14 ou BSA (controle negativo) em 100 μ L de PBS, durante 16 horas a 4 °C. A placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e bloqueada por 2 horas a 37 °C com PBS-T contendo 10% (m/v) leite em pó desnatado. Após o bloqueio, um micrograma de PLG humano foi adicionado em cada poço e a placa foi incubada por 2 horas a 37 °C. Novamente a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e então foram adicionados 4 ng do ativador de PLG tipo uroquinase humana (uPA; Sigma-Aldrich), e o substrato *D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride* (Sigma-Aldrich), na concentração final de 0,4 mM em 100 μ L de PBS. A placa foi incubada durante 16 horas a 37 °C e a degradação do substrato cromogénico foi detectada na DO 405 nm. Foram utilizados controles nos qual pelo menos um dos componentes da reação foi omitido. Para análise estatística, a ligação da proteína aos componentes foi comparada com a ligação com o controle negativo BSA pelo teste *t-Student* (* $p < 0,1$).

3.23 Ensaio de detecção das proteínas correspondentes em bactérias intactas

Foram utilizados 10 mL de cultura de leptospiros (*L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M-20). A concentração de bactérias foi determinada por meio de contagem em câmara Petroff-Hausser.

As bactérias foram centrifugadas a $4628 \times g$ por 10 minutos a 23 °C e o *sedimento* bacteriano foi lavado com tampão PBS1s. Em uma placa de 96 poços foram imobilizadas 10^7 bactérias por poço durante 16 horas a 4 °C. A placa foi lavada 3 vezes utilizando PBS1s, e posteriormente foi bloqueada com solução contendo 10% leite desnatado em pó no tampão PBS1s por 2 horas a 37 °C. Após o bloqueio, a placa foi lavada 3 vezes com PBS1s e foram adicionados os respectivos antissoros contra proteína recombinante rLIC11122, rLIC12287 e

DnaK na diluição de 1:50, 1:50 e 1:100 respectivamente, e então a placa foi incubada por 2 horas a 37 °C. Em seguida, a placa foi lavada 3 vezes com PBSIs e incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase por 1 hora a 37 °C. Após a incubação, a placa foi lavada novamente e a reatividade revelada utilizando-se OPD em tampão citrato fosfato.

As análises estatísticas foram feitas comparando os valores de DO obtidos para os controles DnaK proteína citoplasmática, Guerreiro et al. (2001), calculado pelo teste t-student bicaudal pareado considerado o valor de (* $P < 0,05$).

3.24 Ensaio de detecção das proteínas recombinantes em diferentes cepas de *Leptospira*

A concentração de bactérias foi determinada por meio de contagem em câmara Petroff-Hausser em microscópio de campo escuro, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Leptospiras/mL} = \text{N}^{\circ} \text{ de células bactérias quadrante central} \times 50 \times 50.000$$

Foram utilizadas 10 mL de cultura da cepa não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1, e das cepas patogênicas *L. interrogans* sorovares Copenhageni cepa M20, Kennewicki cepa Pomona Fromm e Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, as bactérias foram centrifugadas a 4628 $\times$ g por 10 minutos a 23 °C e o sedimento bacteriano foi lavado com tampão PBSIs.

Em uma placa de 96 poços foram imobilizadas 10^7 bactérias por poço durante 16 horas a 4 °C. A placa foi lavada 3 vezes utilizando PBSIs, e posteriormente foi bloqueada com solução contendo 10% leite em pó desnatado e 5% de BSA diluído no tampão PBSIs, por 2 horas a 37 °C. Após o bloqueio, a placa foi lavada 3 vezes com PBSIs e foram adicionados os respectivos antissoros, contra proteína recombinante rLIC11122 e rLIC12287 na diluição de 1:50, e então a placa foi incubada por 2 horas a 37 °C. Em seguida, a placa foi lavada 3 vezes utilizando PBSIs e incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase por 1 hora a 37 °C. Após a incubação a placa foi lavada novamente e a reatividade revelada utilizando OPD em tampão citrato fosfato, conforme descrito previamente (seção 3.16).

Para as análises estatísticas, foram considerados os valores de DO obtidos para a M-20, em relação às outras cepas, expressos em porcentagem, utilizando o teste t-Student e o valor de (* $P < 0,05$) foi considerado significativo.

3.25 Ensaio de acessibilidade por proteinase K (pK)

A concentração de bactérias foi determinada por meio de contagem em câmara Petroff-Hausser, conforme descrito acima (seção 3.20).

Foram utilizadas concentrações de 10^9 leptospiroas/mL para cada tratamento (*L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M-20). As bactérias foram centrifugadas a $4628 \times g$ por 15 minutos à temperatura ambiente; o sedimento bacteriano foi lavado com tampão PBSls contendo 5 mM de $MgCl_2$. Após as lavagens, as *Leptospiras* foram ressuspensas em um tampão de proteólise (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 5 mM $CaCl_2$) contendo 25 $\mu g/mL$ de proteinase K (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas por até 4 horas e a reação foi interrompida nos tempos determinados utilizando PMSF, um inibidor de serino-protease. As suspensões foram centrifugadas a $12.857 \times g$ por 5 minutos, e o sedimento lavado duas vezes com PBS ls. Após as lavagens, as bactérias foram ressuspensas em PBSls e imobilizadas em microplaca de 96 poços. Foi realizado um ELISA utilizando os antissoros contra rLIC11122 e rLIC12287 (nas diluições 1:50) e DnaK (1:100), utilizada como controle de integridade celular por se tratar de uma proteína citoplasmática (GUERREIRO et al., 2001).

3.26 Comitê de Ética animal e humana

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil, sob o protocolo 1192/14. O Comitê de Pesquisa Animal no Instituto Butantan segue as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

O presente trabalho foi avaliado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP_{SH}), que certificou que o trabalho realizado não envolve manipulação humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por esta Comissão, sob o protocolo nº658/14.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sabe-se que os microrganismos patogênicos possuem mecanismos de invasão e evasão do sistema imune do hospedeiro. As proteínas de membrana externa são as primeiras a entrarem em contato com hospedeiro durante uma infecção, contribuindo para a sobrevivência, adesão e persistência do patógeno. Pesquisas demonstraram que leptospiros são capazes de utilizar essas proteínas de superfície para se disseminarem no hospedeiro (CULLEN, 2002; HAAKE; MATSUNAGA et al., 2005, HAAKE, 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

Assim, no presente trabalho, os genes LIC10377, LIC11122, LIC11184 e LIC12287, identificados no genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004ab), foram selecionados principalmente com base na sua localização celular, por ferramentas de bioinformática, utilizadas para auxiliar nessa seleção.

Um resumo de todas as análises de bioinformática realizadas para os quatro genes selecionados para o estudo podem ser observado na (Tabela 2).

Gene ID	Localização celular segundo PSORT	Localização celular segundo CELLO	Sítio de Clivagem (LipoP)	Domínio conservado (PFAM)	Números de cópias MALMSTRON et al., 2009
LIC10377	Membrana interna (38%)	Extracelular (60%)	SpII 18-19	-	NQ
LIC11122	Membrana interna (50%)	Citoplasmática (82%)	SpII 20-21	FecR	47
LIC11184	Membrana externa (93%)	Extracelular (51%)	SpII 17-18	He_PIG	NQ
LIC12287	Citoplasmática (92%)	Periplasmática (49%)	SpI 21-22	TRL-like protein Family	5168 292

Tabela 2 - Análise *in silico* das sequências de aminoácidos codificadas pelos genes LIC10377, LIC11122, LIC11184 e LIC12287. NOTAS: Gene ID: identificação do gene no genoma *L. interrogans* sorovar Copenhageni – LIC. NASCIMENTO et al. (2004ab). NQ: Não quantificado.

De acordo com os programas PSORT (YU et al., 2006; 2010) as proteínas codificadas pelos genes LIC10377, LIC11122, são de membrana interna, o gene LIC11184 membrana externa e gene codificador LIC12287 prediz uma proteína citoplasmática. A predição realizada pelo software CELLO demonstrou que os genes estudados LIC10377 e LIC11184

codificam proteínas extracelulares, os genes LIC11122 e LIC12287 são citoplasmática e periplasmática respectivamente.

Devido às sequências das espiroquetas exibirem maior plasticidade do que outras bactérias, a aplicação de algoritmos de predição existentes para dados de sequência de *Leptospira* tem apresentado alguns problemas (SETUBAL et al., 2006). Todas as proteínas de membranas externas de espiroquetas são sintetizadas com o peptídeo sinal em sua região N-terminal, o qual promove a exportação da proteína para seu local de atuação biológica; assim que a proteína é translocada esse peptídeo é clivado em uma região específica (CULLEN; HAKKE; ADLER, 2004). Os sítios de clivagem foram encontrados em todas as proteínas programa LipoP (JUNCKER et al., 2003), observamos que as sequências de aminoácidos nos três genes LIC10377, LIC11122 e LIC11184 apresentam sítio de clivagem *SpII*. Esse sinal é reconhecido por uma enzima chamada de peptidase sinal II, a qual é responsável pela clivagem e lipidação do peptídeo sinal em lipoproteínas. Esse fato sugere fortemente que as lipoproteínas codificadas por esses genes serão encaminhadas à membrana.

A sequência codificada pelo gene LIC12287 apresentou o sítio de clivagem para a enzima sinal peptidase I (*SP1*), indicando que o gene pode codificar uma proteína que é exportada à membrana.

As quatro proteínas codificadas pelos genes em estudo foram identificadas no trabalho de proteoma quantitativo em *L. Interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 (cepa virulenta), sendo que os genes LIC10377 e LIC11184, não foram quantificados, pois o número de cópias ficou abaixo do limite de detecção, LIC11122 e LIC12287, apresentaram 47 e 292 cópias por célula bacteriana respectivamente (MALMSTROM et al., 2009).

Uma recente reavaliação dos genomas depositados no GenBank (2015), mostrou que o gene LIC11122 o qual foi descrito inicialmente como codificante para uma provável lipoproteína (AAS69729.1), foi reanotado como gene codificante para fator sigma (WP_002082493.1), que são reguladores transcricionais, uma classe de proteínas dissociáveis da RNA polimerase bacteriana. Podem desempenhar várias funções como, por exemplo, ativadores de resposta ao estresse, envolvidos principalmente nas alterações morfológicas do organismo (como a formação de flagelos e esporulação). Exercem também função extracitoplasmática, ativando mecanismos de adaptações às mudanças no periplasma, na membrana da bactéria e no ambiente extracelular (KAZMIERCZAK et al., 2005).

O gene codificador LIC12287, foi descrito como codificante para uma proteína de secreção em um trabalho de proteoma de exoproteínas e também foi quantificada, no entanto a sua função não foi explorada. A maioria das exoproteínas de *L. interrogans* pode estar envolvida

em funções de geração metabólica e de energia, que são provavelmente essenciais para a sobrevivência nos diversos ambientes encontrados por estas bactérias (ESHGHI et al., 2015).

As proteínas conhecidas por ter uma função no interior da célula, mas também estão localizadas na superfície da célula, atuando em função diferente (ou múltiplas funções) (ESHGHI et al., 2015). Estas são referidas como proteínas *moonlighting*. A primeira proteína descrita com essa atividade foi a enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que foi caracterizada como capaz de se ligar ao plasminogênio (NOGUEIRA et al., 2013). Em *Streptococcus suis* sorotipo 2 essas características estão presentes para algumas chaperonas, como a DnaK, que também apresentou uma forte ligação com o plasminogênio, assim como a DnaK de *Bifidobacterium*. Em *Legionella pneumophila* a GroEL foi identificada como uma adesina, promovendo ligação da bactéria patogênica à célula HeLa e atuando desta forma na invasão da bactéria (BRASSARD et al., 2004; GARDUÑO et al., 2011 ; KENN & FINLAY, 1995; JEFFERY et al., 2015; LOTTENBERG et al., 1992; PANCHOLI & FISCHETTI, 1998).

Foi realizada, uma predição dos domínios proteicos que as sequências selecionadas apresentam. Essas análises são importantes porque diversas proteínas presentes na superfície celular carregam em suas estruturas sequências conservadas que são responsáveis por desempenhar uma função específica. Para analisar tal propriedade, o programa PFAM (LETUNIC et al., 2006; SCHULTZ et al., 1998; SONNHAMMER; EDDY; DURBIN, 1997), foi utilizado e os resultados gerados mostraram a identificação de domínios revelantes e estão representados logo abaixo.

O primeiro domínio avaliado é da sequência de aminoácidos codificada pelo gene LIC11122, chamado de *FecR*, está definido como “*FecR protein*” pelo PFAM e corresponde a uma família de domínios proteicos envolvidos na regulação do transporte de citrato de ferro. Na ausência do citrato de ferro, se torna inativo, sendo receptor que reconhece citrato de ferro no periplasma. Sabemos que o ferro é um cofator essencial para muitas enzimas encontradas em quase todos os organismos vivos (GRIFFITHS et al., 1999). Para satisfazerem as suas necessidades de ferro, microrganismos desenvolveram estratégias, como a ligação direta às proteínas que contêm ferro encontrado nos seus nichos ecológicos e aos receptores específicos de membrana externa, como pode ser o caso do domínio estudado. A capacidade de adquirir complexos de ferro tem sido reconhecida como um importante determinante da virulência bacteriana (BRAUN et al., 2001).

O segundo domínio identificado foi na sequência de aminoácidos codificada pelo gene LIC11184, o domínio *He_PIG* “*Putative Ig domain*”, da família *CA_like*, que são

glicoproteínas envolvidas na adesão célula-célula mediada por cálcio (Ca^{2+}). Os domínios de repetição caderina aparecem com repetições em série nas regiões extracelulares, que medeiam o contato célula-célula quando ligado ao cálcio (VAN HOVE et al., 1990). Eles desempenham diversos papéis no destino celular, de sinalização, de proliferação, diferenciação e migração.

O domínio presente na sequência de aminoácidos codificada pelo gene LIC112287 é denominado de *TRL-like*, que se encontra num *locus* que inclui vários RNA transportador. A função desta família de proteínas não é conhecida. Segundo o programa de predição PFAM, as proteínas desta família têm geralmente um local de ligação de lipoproteína na sua extremidade N-terminal.

Os resultados obtidos sugerem que as proteínas codificadas pelos 4 genes estudados apresentam possibilidade destas moléculas estarem presentes na superfície, e em consequência disso, desempenharem funções importantes na patogênese bacteriana.

4.1 Análise *in silico* da presença dos genes em *Leptospira* spp.

Como mencionado anteriormente (seção 1.1), as leptospiros são bactérias com uma grande variabilidade antigênica devido a resposta heterogênea aos lipopolissacarídeos presentes em sua membrana, portanto proteínas que sejam conservadas entre suas diversas espécies e sorovares são importantes quando se trata do estudo de um antígeno vacinal em potencial.

A análise da similaridade das sequências de aminoácidos de interesse com sequências de diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* depositadas em um banco de dados utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990, 1997) demonstrou que as sequências estudadas são conservadas em diferentes espécies patogênicas de *Leptospira* (Figura 5). Apenas a sequência correspondente ao gene LIC12287 (Figura 5D) apresentou um percentual de similaridade com uma sequência presente na espécie não patogênica *L. biflexa*, porém os braços mais distantes do filograma apontam uma identidade abaixo de 50%. O fato de essas proteínas apresentarem grau de conservação *in silico* entre às espécies patogênicas de *Leptospira* as tornam alvos interessantes de estudo (JACKSON et al., 1993).

A **B**

Figura 5 - Filograma das sequências de aminoácidos codificadas pelos genes LIC10377, LIC11122, LIC11184 e LIC12287. A similaridade das sequências de aminoácidos em estudo com as de outras espécies de *Leptospira* foi avaliada pela ferramenta BLAST e os filogramas foram gerados pelo programa ClustalW2. A filogenia dos genes (A) LIC10377, (B) LIC11122, (C) LIC11184 e (D) LIC12287, revelou uma proximidade dos genes de estudo com cepas patogênicas de *Leptospira*.

4.2 Clonagem e expressão dos genes selecionados

Para conseguir avaliar um possível papel dos genes LIC10377, LIC11122, LIC11184 e LIC12287 em processos de invasão e evasão imune das leptospiros realizamos primeiramente suas clonagens. Oligonucleotídeos específicos (Quadro 1) foram utilizados para amplificar por PCR, sem o peptídeo sinal de exportação, os fragmentos de DNA correspondentes aos genes selecionados a partir do DNA genômico da *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Os *amplicons* obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose e apresentaram os tamanhos esperados de 750, 576, 660 e 406 pares de bases (pb) correspondentes aos fragmentos LIC10377, LIC11122, LIC11184 e LIC12287, respectivamente (Figura 6).

Figura 6 - Análise dos fragmentos de DNA obtidos por amplificação em reação de PCR. O DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M-20) foi extraído e utilizado na reação de PCR como modelo para amplificação dos genes de interesse utilizando o oligonucleotídeos específicos. Os produtos de PCR amplificados foram analisados em gel de agarose 1% e apresentaram os seguintes tamanhos (A) LIC10377 / 750 pb, (B) LIC11122 / 576 pb, (C) LIC11184 / 660 pb e (D) LIC12287/406 pb. M, corresponde ao marcador 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen) para todos os géis.

Uma vez purificados, os produtos de PCR (*amplicons*) foram utilizados para subclonagem em vetor pGEM-T Easy da Promega. Assim, após a ligação do inserto neste vetor, o mesmo foi introduzido, por choque térmico, em *E. coli* DH5 α (tornadas previamente competentes). Os clones supostamente positivos (colônias brancas) tiveram seus DNAs extraídos que subsequentemente foram submetidos a ensaio com enzimas de restrição para a análise da liberação do inserto de tamanho esperado em gel de agarose. Após a digestão com as enzimas específicas para a LIC10377, LIC11184 e LIC12287 (*XhoI/HindIII*) e para LIC11122 (*XhoI/KpnI*), houve a liberação do inserto no tamanho esperado para cada gene, confirmando sua inserção no vetor conforme mostrado na (Figura 7).

Figura 7 - Análise de restrição enzimática após a ligação dos produtos de PCR com o vetor de clonagem pGEM-T Easy. O plasmídeo foi introduzido em uma linhagem competente de *E. coli* DH5 α , o DNA plasmidial foi extraído e submetido a um teste de digestão com as enzimas *XhoI* e *HindIII* ou *KpnI*. **(A)** LIC10377 (750 pb), **(B)** LIC11122 (576 pb), **(C)** LIC11184 (660 pb) e **(D)** LIC12287 (406 pb). Amostras: 1, 3 e 5 inserto ligado ao vetor, utilizados como controle; 2, 4 e 6 amostras submetidas ao ensaio com as enzimas de restrição, mostrando a liberação do inserto (indicado para cada gene pela seta preta); M, Marcador molecular (1 Kb Plus DNA Ladder).

Os insertos removidos do plasmídeo pGEM-T Easy foram utilizados para ligação ao vetor de expressão pAE, o qual diferentemente do pGEM-T Easy, não possui um diferencial colorimétrico para seleção das colônias positivas e negativas. Sendo assim, as colônias supostamente positivas foram selecionadas por extração plasmidial rápida por fenol-clorofórmio. Com esta técnica (dados não mostrados), os clones possivelmente positivos apresentam um aumento de massa em relação ao vetor selvagem, sugerindo a inclusão do inserto de interesse no vetor. Esses clones foram selecionados e submetidos ao ensaio de restrição enzimática para verificar se de fato houve ligação do inserto.

Os clones selecionados da LIC10377, LIC11184 e LIC12287, digeridos com as respectivas enzimas *XhoI* e *HindIII*, apresentaram um fragmento de DNA de tamanho esperado. A mesma situação foi observada para o clone referente à LIC11122, após o ensaio de restrição com as enzimas *XhoI* e *KpnI* (Figura 8).

Figura 8 - Análise dos fragmentos de DNA após digestão do plasmídeo pAE-LIC em gel de agarose.

O DNA plasmidial pAE/LIC diregido com as enzimas de restrição foi visualizado em gel de agarose 1% corado com GelRedTM somente após o plasmídeo ser digerido com as duas enzimas. Seta preta corresponde aos respectivos pares de bases de cada gene. O número 1 em todas as figuras corresponde ao marcador 1Kb plus DNA. (A) corresponde ao gene **LIC10377**; o número 2 (pAE+*xhoI*); 3 (pAE +*XhoI*+*HindIII*+LIC10377); 4 (pAE+*HindIII*); 5 (pAE circular). (B) corresponde ao gene **LIC11122**; 2 (*XhoI*+LIC11122); 3 (*KpnI*+LIC11122); 4 (pAE+*KpnI*+*XhoI*+LIC11122); 5 (pAE circular); 6 (pAE+*XhoI*+*KpnI*). (C) corresponde ao gene **LIC11184**; 2 (pAE circular); 3 (pAE+ *XhoI*); 4 (pAE+ *HindIII*); 5 (pAE + *XhoI*+*HindIII*+LIC11184). (D) corresponde ao gene **LIC12287**; 2 (pAE circular); 3 (pAE+*XhoI*); 4 (pAE+ *HindIII*); 5 (pAE circular+ *XhoI*+*HindIII*+LIC12287); 6 (pAE+LIC12287); 7 (pAE+*HindIII*+LIC12287); 8 (pAE+*HindIII*+*XhoI*+LIC12287).

Para certificar que os fragmentos liberados de fato correspondiam aos genes estudados, todos os clones relacionados a cada gene foram submetidos ao sequenciamento pelo método de terminação em cadeia. Dados obtidos após sequenciamento das construções revelaram que os genes LIC10377, LIC11122 e LIC12287 foram clonados em fase correta de leitura no vetor pAE e não apresentaram nenhum tipo de mutação (Figura 9). No entanto, clone referente ao gene LIC11184 apresentou dois pontos de mutação, sendo que uma foi silenciosa. A clonagem foi refeita, porém os mesmos problemas foram encontrados, e por isso decidimos interromper os estudos com este gene LIC11184 (dado não apresentado).

Na figura 9 é possível observar que as sequências, LIC10377, LIC11122 e LIC12287 o códon de início ATG, seguido dos códons que codificam para as seis histidinas, os ccdóns que correspondem ao sítio de restrição *XhoI* e o início do gene selecionado.

Figura 9 - Eletroferograma das construções geradas. (A) pAE+LIC10377; (B) pAE +LIC12287 e (C) pAE+LIC11122 foram submetidas ao sequenciamento pelo método de terminação em cadeia. As sequências marcadas em preto correspondem códon de iniciação; em azul códon das 6 sequências de histidinas; vermelho códons da enzima de restrição *XhoI*; em amarelo início do gene.

4.3 Avaliação da expressão das proteínas recombinantes

Com a finalidade de expressar os genes de interesse, o vetor pAE contendo os genes LIC10377, LIC11122 e LIC12287, foi inserido em linhagens de *E. coli* BL21(DE3), BL21 Star(DE3)pLysS, C43(DE3) e BL21-SI.

Os plasmídeos foram inseridos nas linhagens de *E. coli* tornadas previamente competentes por transformação por choque térmico. As bactérias transformadas foram cultivadas até a fase log para a indução da expressão dos plasmídeos recombinantes com diferentes concentrações de indutores. Em seguida, as culturas foram centrifugadas e a massa bacteriana obtida foi lisada e separada em duas frações, uma solúvel e outra insolúvel, que correspondem respectivamente ao sobrenadante e ao sedimento.

Os resultados obtidos após análise em SDS-PAGE 15% mostraram que todas as linhagens testadas de *E. coli* não foram capazes de expressar o gene LIC10377, após várias tentativas resolvemos encerrar os estudos com a mesma (dados não apresentados). Em relação ao do gene LIC11122, foi observada a expressão com tamanho esperado de 20 kDa nas linhagens

testadas de *E. coli*, em ambas as frações solúveis e insolúveis, sendo a maior expressão na cepa BL21-SI induzida com 75 mM de NaCl, sob a forma solúvel (Figuras 10A, seta preta).

O gene codificador para a proteína recombinante LIC12287 também apresentou expressão no tamanho esperado de 14 kDa, sendo mais significativa na cepa BL21 Star(DE3) pLysS quando induzida com 0,01 mM IPTG, em corpúsculo de inclusão, como observado na figura 10D (seta preta). Foram testadas para a expressão da rLIC12287 em cepas BL21 (DE3) e C43(DE3), mas não houve expressão da proteína recombinante (dados não mostrados).

Figura 10 - Análise da expressão das proteínas recombinantes em cepas de *E. coli*. por SDS-PAGE corado com Coomassie blue. (A) Expressão da proteína rLIC11122 utilizando a cepa BL21-SI (75,150 e 300 mM NaCl) e (B) cepa BL21(DE3) (0,01, 0,1 e 1 mM do IPTG). (C) expressão da rLIC12287 utilizando a cepa BL21-SI (75,150 e 300 mM NaCl) e (D) a cepa BL21 Star(DE3) pLysS (0,01, 0,1 e 1 mM do IPTG). Em todos os géis, o M corresponde ao marcador LMW; (1) é a cepa transformada com a construção pAE-LIC, mas não induzida; (2) é a cepa transformada com a construção pAE-LIC cultivada na concentração máxima de indutor; (3, 5 e 7) apenas a fração solúvel após a lise celular; (4, 6 e 8) apenas a fração insolúvel após a lise celular. As proteínas recombinantes estão indicadas nos géis por uma seta (preta), com aproximadamente sua massa molecular predita de 20 kDa (rLIC11122) e 14,15 kDa (rLIC12287).

Para confirmação da expressão das proteínas recombinantes foi realizado um imunoblotting utilizando o anticorpo monoclonal antipoli-histidina, uma vez que o vetor de

expressão pAE (RAMOS et al., 2004) permite a clonagem dos genes com 6 resíduos de histidinas, sendo expressas na região N-terminal da proteína recombinante. Para esse ensaio os extratos bacterianos foram aplicados em gel SDS PAGE 15%, 20 µL de bactéria sem transformação (selvagem), 20 µL de bactéria transformada, mas não induzida e 20 µL das frações com expressões aparentes e transferidos para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo monoclonal antipoli-histidina conjugado com peroxidase. Bandas na altura esperada das massas moleculares correspondentes as proteínas recombinantes foram detectadas pelo anticorpo rLIC11122 - 20 kDa; rLIC12287-14,15 kDa (Figura 11A e B). Na figura 11B, além da banda de 14 kDa, podemos observar ainda a detecção de uma banda na altura de 30 kDa, sugerindo formação de dímeros e trímeros da proteína recombinante rLIC12287.

Figura 11 - Detecção das proteínas recombinantes por anticorpo monoclonal antipoli-histidina. (A) rLIC11122 (Lsa19). **(B)** rLIC12287 (Lsa14). Extratos de *E. coli* foram aplicados em gel SDS-PAGE 15% e transferidos para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo monoclonal antipoli-histidina conjugado com peroxidase. Para todas as figuras **M** corresponde ao marcador LMW. **(1)** *E. coli* BL21-SI **(A)** ou Star(DE3) pLysS **(B)** selvagem; **(2)** extrato bacteriano transformado e não induzido **(3)** lisado bacteriano transformado e induzido com 75 mM de NaCl **(A)** ou 0,1 mM de IPTG **(B)** **(4)** sobrenadante da cultura induzida com 75 mM de NaCl **(A)** ou 0,1 mM de IPTG **(B)** após lise e centrifugação **(5)** corpúsculo de inclusão solubilizado. A seta preta corresponde a repectiva massa molecular de cada proteína recombinante. A seta cinza corresponde a possível formação de dímero da rLIC12287.

4.4 Purificação e diálise das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas recombinantes foi feita por cromatografia de afinidade ao metal, utilizando coluna com resina “*Chelating Sepharose*” (GE Healthcare) tratada com cátions de níquel. Como mencionado anteriormente, as proteínas recombinantes são expressas com uma sequência de seis resíduos de histidinas, devido ao plasmídeo pAE utilizado para sua

clonagem (RAMOS et al., 2004). Os anéis imidazólicos presentes nos resíduos de histidina possuem uma alta afinidade ao níquel, e ao passarem pela coluna impregnada se ligam a ele; além das proteínas recombinantes, alguns contaminantes da cultura bacteriana se ligam fracamente à coluna, sendo então lavados com tampão contendo baixa concentração de imidazol. O imidazol compete com os anéis imidazólicos presente nas sequências de histidinas pela ligação ao níquel, portanto podemos eluir as proteínas recombinantes utilizando alta concentração deste composto.

A rLIC11122 foi purificada a partir do sobrenadante da cultura de *E. coli* BL21-SI obtido após a lise bacteriana. Como a proteína rLIC12287 foi expressa na forma insolúvel, foi necessária sua solubilização em tampão de desnaturação contendo 8M ureia, a qual foi posteriormente removida. A renaturação da proteína foi feita durante a purificação, por gradiente de remoção de ureia, e a sua eluição foi feita com 1 M de imidazol. Após a diálise em tampão adequado para remover o imidazol, a concentração das proteínas foi estimada por comparação com massas pré-estabelecidas de BSA (4 µg, 3 µg, 2 µg e 1 µg) utilizando o software *Gel Quant Express Analysis* GelQuant (2003) que relaciona as densitometrias para estimar as massas das bandas de interesse (Figura 12). As concentrações obtidas foram de 0,16 µg/µL para proteína rLIC12287 e de 0,36 µg/µL para proteína rLIC11122.

Figura 12 - Estimativa da concentração das proteínas recombinantes purificadas. As proteínas recombinantes purificadas foram dialisadas, separadas por SDS-PAGE 15% e coradas com *Comassie Blue*. Suas concentrações foram estimadas por comparação com massas conhecidas de BSA. **1** Fração da rLIC11122 purificada e após diálise (massa molecular 20 kDa). **2** Fração da rLIC12287 purificada e após diálise (massa molecular 14,15 kDa). Os números **3, 4, 5 e 6**, correspondem às massas conhecidas de BSA em microgramas (4, 3, 2 e 1, respectivamente). As setas (pretas) apontam as proteínas recombinantes. **M** é o marcador LMW.

4.5 Avaliação da estrutura secundária das proteínas recombinantes rLIC11122 e rLIC12287 por dicroísmo circular.

Após a obtenção das proteínas recombinantes purificadas, estas foram submetidas à espectroscopia por dicroísmo circular (CD) para verificar se após o processo de purificação elas apresentavam conformação esperada. O CD é uma técnica que permite o estudo das estruturas secundárias das proteínas, α -hélice, estruturas β e estruturas irregulares (KELLY; JESS; PRICE, 2005). Essa técnica está baseada no fato de que moléculas com centros assimétricos (quirais) absorvem luz circularmente polarizada para a direita diferentemente da luz circularmente polarizada para a esquerda, provocando um desvio no ângulo da polarização da luz incidente para a direita ou esquerda (elipticidade), que é medido pelo polarímetro. Os cromóforos que originam os espectros de CD em peptídeos e proteínas são as ligações amida, os resíduos aromáticos e as pontes dissulfetos (CLARK et al., 1968).

Proteínas com estruturas α -hélice possuem faixas negativas a 208 e 222 nm e uma faixa positiva de 193 nm, já folhas- β antiparalelas apresentam faixas negativa a 218 nm e uma positiva de 196 nm, e as proteínas com conformação irregulares apresentam sinais de elipticidade muito baixos com faixas positivas e negativas de 212 e 198 nm, respectivamente (RANJBAR; GILL, 2009).

Informações sobre a estrutura de proteínas são importantes para que possamos dar continuidade com os trabalhos. Após a obtenção do espectro, o mesmo foi analisado pelo software CAPITO (WIEDEMANN et al., 2013), gerando as possíveis estrutura secundária de cada proteína recombinante (Figura 13). Em paralelo realizamos a predição pela sequência de aminoácidos de cada recombinante, que pode ser visualizada pela Tabela 3.

Figura 13 - Espectros de dicroísmo circular das proteínas recombinantes purificadas. (A) proteína rLIC11122. (B) Proteína rLIC12287. O espectro foi medido usando uma célula de 1 mm e apresentado como uma média de 5 leituras em intervalos de 190 a 260 nm.

Proteína	Folha β (%)		α -hélice (%)		Irregulares (%)	
	Predita	Experimental	Predita	Experimental	Predita	Experimental
rLIC11122	49	51	12	6	38	48
rLIC12287	55	50	24	10	20	42

Tabela 3 - Tabela como análise dos espectros de CD e da predição com base nas sequências de aminoácidos obtidos pelo programa CAPITO. Na tabela pode-se observar os valores das estruturas secundárias de ambas as proteínas (rLIC11122 e rLIC12287) e suas respectivas predições. Os valores foram expressos em porcentagem.

Foi possível verificar que ambas as proteínas demonstraram um perfil estruturado, apresentando maiores porcentagens de estruturas folha- β e irregulares, para as duas proteínas. Embora a proteína rLIC12287 tenha apresentado uma porcentagem superior de estruturas irregulares em relação a sua quantidade predita, a quantidade de estruturas folha β detectadas está bem próxima da sua predição. Essa divergência pode ser devido ao fato de que esta proteína apresentou uma instabilidade quando em contato com o tampão fosfato, indicado para realização do dicroísmo circular. De qualquer forma, os processos de desnaturação e renaturação pelos quais a rLIC12287 foi submetida, parecem não terem afetado sua estrutura secundária de maneira relevante. Sendo assim, os resultados obtidos no dicroísmo circular de cada uma das proteínas foram importantes para nos dar segurança em prosseguir com experimentos de caracterização de função e imunogenicidade das proteínas recombinantes em estudo.

4.6 Avaliação da atividade imunológica das proteínas recombinantes em camundongos BALB/c

Essa etapa do trabalho visa avaliar se as proteínas recombinantes rLIC11122 e rLIC12287 são capazes de estimular o sistema imune dos camundongos, induzindo uma resposta imune, com a produção de anticorpos IgG contra as recombinantes estudadas. Para atingir tal objetivo, camundongos BALB/c receberam 3 doses por via subcutânea da seguinte formulação vacinal: 10 μ g da proteína recombinante rLIC11122 e rLIC12287 em associação com o adjuvante *Alhydrogel* (2% Al(OH)₃).

Duas semanas após cada dose, esses animais foram sangrados e os soros obtidos foram avaliados. Os dados apresentados na (Figura 14), mostram que as duas proteínas recombinantes testadas foram capazes de induzir uma resposta imune humoral. No entanto, a capacidade de indução da proteína rLIC11122 foi inferior, quando comparada com a proteína rLIC12287. Esta última alcançou o título de 204.800, em quanto que o título em resposta a recombinante rLIC11122 é 51.2000.

Figura 14 - Avaliação da atividade imunogênica em camundongos imunizados com as proteínas recombinantes (rLIC11122) e (rLIC12287): Em placa de ELISA foi imobilizado 250 ng/ poço de proteína recombinante. A placa foi incubada com o *pool* de soros dos animais imunizados, numa diluição de 1:200 e então foi feita uma diluição seriada até 1:204800. A reatividade foi sondada utilizando anticorpo contra IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000. O título foi considerado o quociente da diluição a qual apresentou uma absorbância de 0,1. Os dados estão expressos em logaritmo de base 2.

O reconhecimento das proteínas recombinantes pelos soros policlonais foi avaliado por ensaio de imunoblotting. Para isso, 0,05 µg de cada proteína rLIC11122 e rLIC12287 e Lsa23 (usada como controle negativo), foram aplicados em gel SDS e transferidos para membrana de nitrocelulose. As proteínas foram incubadas com antissoro correspondente, e detectadas por quimiluminescência. Os resultados mostraram que ambas as proteínas foram detectadas pelos antissoros correspondentes, anti-rLIC11122 e anti- rLIC12287, enquanto que o controle Lsa23 não foi detectado, demonstrando a especificidade dos antissoros produzidos (Figura 15). Na figura 15B, além da banda de 14 kDa correspondente a proteína rLIC12287, foi detectada uma banda mais fraca de aproximadamente 30 kDa, corroborando com a hipótese de que essa proteína recombinante é capaz de formar dímeros.

Figura 15 - Detecção das proteínas recombinantes por Western Blotting utilizando o antissoro policlonal anti-rLIC. As proteínas foram aplicadas em SDS-PAGE 15% e transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com os antissoros anti- rLIC11122 (A) e anti- rLIC12287 (B) e seguida do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Em todos os géis **3 e 5** correspondem a proteína Lsa23, utilizada como controle negativo. O número **(1)** corresponde ao marcador molecular LMW. **(2)** rLIC11122, massa molecular 20 kDa. **(4)** rLIC12287, massa molecular de 14,15 kDa, na figura é possível observar a formação do dímero (seta cor cinza) que foi reconhecido pelo antissoro na altura de 30 kDa. **M**, marcador molecular LMW.

Estudos demonstraram que a imunidade protetora contra as leptospiros não é apenas humoral (FAINE et al.,1999). Foi relatado a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e $\gamma\delta$, atuando na imunidade adaptativa de bovinos. Foi demonstrado também que leptospiros patogênicas induzem resposta Th1 combinada com produção de anti-LPS (NAIMAN et al., 2001; VERNEL-PAUILLAC).

Para avaliar as propriedades imunogênicas das proteínas detalhadamente, 15 dias após a última imunização, os animais foram eutanasiados e seus baços foram removidos e processados para avaliação da proliferação celular após estimulação *in vitro* com as proteínas recombinantes. O controle positivo utilizado foi a lecitina concanavalina A (ConA), que é um mitógeno de ativação de linfócitos. Embora cada grupo tenha apresentado um nível diferente de proliferação, em todos os grupos as células apresentaram níveis de proliferação significativos quando comparados com o grupo controle sem estímulo (meio RPMI), mostrando assim a viabilidade do experimento (Figura 16). A ativação de células T pode favorecer a ativação de linfócitos B para produção de anticorpos específicos, estimulam células citotóxicas que podem desempenhar suas atividades de forma mais potente, de células de memória que são

fundamentais pelo fato de serem rapidamente ativadas após uma segunda exposição ao antígeno (KALIL et al., 2008). Entretanto, os resultados obtidos mostraram que ambas as proteínas recombinantes não foram capazes de estimular *in vitro* a proliferação celular quando comparado com o grupo de animais imunizados que não receberam estímulo *in vitro* (Figura 16), sugerindo assim, que não são capazes de ativar uma resposta imune celular.

Figura 16 - Avaliação da proliferação de esplenócitos. A proliferação celular foi analisada a partir de células de baço de camundongos imunizados com **rLIC11122** e **rLIC12287** ou animais controle, inoculados com PBS. As células foram cultivadas sem estímulo (meio RPMI – controle negativo) ou então estimuladas com o mitógeno ConA (controle positivo, 5µg/mL) ou proteína (5 µg/mL). A resposta de proliferação foi medida indiretamente por meio de incorporação do BrdU. Os valores representam o valor de DO $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes. As comparações para análise estatística foram feitas pelo teste *t-Student* entre células do mesmo grupo de animais imunizados que receberam estímulos *in vitro* e que foram apenas incubadas com meio RPMI (* $P < 0,05$).

4.7 Avaliação da expressão e localização celular

Já é bem estabelecido na literatura que o processo de colonização e invasão dos tecidos de hospedeiros é um passo importante para o início da infecção. Sendo assim, as proteínas de membrana externa são extremamente importantes quando se trata de patogênese por ser o primeiro contato entre o patógeno e o hospedeiro. Desta forma, podem gerar uma resposta imune e estão intimamente relacionadas aos processos de adesão e colonização da bactéria (ATZINGEN et al., 2009; BARBOSA et al., 2006).

A predição da proteína codificada pelo gene LIC11122, como mencionado, foi predita como uma proteína de membrana interna pelo algoritmo para bactérias gram-negativas

do programa PSORT (NAKAI; KANEHISA, 1991; NAKAI; HORTON, 1999). A sequência de aminoácidos codificadora para a proteína LIC12287 foi predita como uma proteína citoplasmática, pelo programa PSORT, e periplasmática pelo programa (CELLO) (YU et al., 2006). No entanto, a identificação de sítios de clivagem pelos programas LipoP e SignalP indicam que em algum momento estas proteínas podem ser exportadas para a membrana. Além disso, recentemente a proteína LIC12287 foi detectada em um estudo de proteoma de exoproteínas de secreção, com função desconhecida.

Para avaliar experimentalmente a possibilidade de as proteínas em estudo estarem expostas na superfície da *Leptospira* primeiramente foi realizado *screening* de bactéria intacta para avaliar se as proteínas correspondentes aos recombinantes estavam sendo expressa em cepas atenuadas de leptospiros, em seguida sua expressão foi comparada em diferentes cepas de *Leptospira*, e por fim foi avaliada sua acessibilidade por proteinase K (PK).

4.7.1 Ensaio de detecção das proteínas nativas em diferentes cepas de *Leptospira*

Realizamos um *screening* para detecção das proteínas correspondentes a rLIC11122 e rLIC12287 na cepa patogênica com virulência atenuada *L. interrogans* sorovar Copenhageni M-20. Para isso, as bactérias foram imobilizadas em microplacas e incubadas com antiproteína. Como controle do experimento foi realizado reações faltando dos componentes. Os resultados mostram que ambas as proteínas são reconhecidas pelos antissoros produzidos contra as recombinantes, pois, houve aumento no sinal de reatividade (Figura 17), indicando que as duas proteínas podem estar sendo expressas na bactéria. Uma reatividade um pouco mais elevada foi observada para a rLIC12287, quando comparada a rLIC11122, e esse evento pode ser em decorrência do número de cópias presente em cada bactéria. Como mencionando anteriormente, a rLIC12287 apresenta 292 cópias/célula, enquanto a rLIC11122 apresenta apenas 47 cópias/célula (MALMSTROM et al., 2009). No entanto, outros eventos como, por exemplo, a exposição de epítomos imunodominantes, pode interferir nesta reatividade.

Figura 17 - Screening para detecção das proteínas em *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M-20. Em placa de ELISA foram imobilizadas 10^7 leptospiros/poço na. Em seguida, foram adicionados os antissoros respectivos de cada proteína recombinante na diluição de 1:50(L+P+S). Como controle dos componentes da reação foi omitido (L+S) e (BSA+P+S). As leituras foram feitas em 492 nm. As barras representam as médias das absorvâncias $\pm$ três desvios padrões para cada ponto e são representativas de dois experimentos independentes. Para análise estatística, os valores de DO obtidos para as leptospiros tratadas com antissoros das proteínas recombinantes foram comparados com os valores de DO dos controles (* $P < 0,05$). As siglas correspondem a: (L) *Leptospira*, (P) antissoro primário (produzido contra as proteínas recombinantes) e (S) antissoro secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase.

Para compararmos a expressão das proteínas nativas em diferentes cepas de *Leptospira* resolvemos realizar um ensaio utilizando a cepa não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1, a cepas patogênicas com virulência atenuada *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M-20 e as cepas patogênicas virulentas *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm LPF e sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. As bactérias foram imobilizadas em placa ELISA (10^7 bactérias/poço) e incubadas com antissoro contra as proteínas rLIC11122 e rLIC12287 na diluição de 1:50. Como esperado, não foi observado reatividade significativa dos antissoros a cepa saprofítica, uma vez que a essa cepa não apresenta sequências similares a rLIC11122 e apenas uma sequência de baixa similaridade a rLIC12287 (veja filograma, figura 5). Podemos observar que às cepas patogênicas apresentam uma maior detecção quando comparada a cepa atenuada M20, sendo para LPF um aumento de 61% e 48% para rLIC11122 e rLIC12287, enquanto que para a L1-130 observa-se um aumento de 26% e 28% para a rLIC11122 e rLIC12287. Dessa forma, podemos sugerir, que ambas as proteínas atuam em algum processo durante a infecção, já que um aumento no sinal de reatividade observado nas cepas virulentas pode indicar um aumento da expressãodas duas proteínas nessas bactérias (Figura 18).

Figura 18 - Detecção indireta das proteínas nativas codificadas pelos genes LIC11122 e LIC12287 em diferentes cepas leptospiras. Cepas patogênicas virulentas LPF e L1-130, cepa patogênica com virulência atenuada M-20 e a cepa saprofítica Patoc 1, foram imobilizadas em placas de microdiluição (10^7 bactérias/poço). Em seguida, foram adicionados os anti-rLIC11122 e anti-rLIC12287 na diluição de 1:50. As leituras foram feitas em 492 nm e os valores foram expressos em porcentagem de detecção. Para as análises estatísticas, teste t-Student foi utilizado para comparar os valores de DO obtidos para cada cepa em relação à cepa M-20 (* $P < 0,05$).

4.7.2 Ensaio de acessibilidade por Proteinase K (PK)

No ensaio de acessibilidade por proteinase K, submetemos leptospiras à degradação de proteínas pela serino protease de amplo espectro PK, por intervalos de tempo de 1, 2 e 4 horas. Com isso podemos comparar o valor de densidade óptica inicial com os valores subsequentes. Considerando que as bactérias estejam intactas, apenas as proteínas de superfície serão submetidas à interação com a enzima PK. Logo, se houver uma diminuição do sinal das proteínas testadas, podemos inferir que as mesmas estão localizadas na membrana externa. Para confirmar a integridade da célula bacteriana durante a interação com PK utilizamos, como controle negativo, antissoro contra a proteína DnaK de *Leptospira*, descrita na literatura como proteína citoplasmática (GUERREIRO et al., 2001). Pode-se observar na (Figura 19), que após 1 hora de tratamento com a PK, as proteínas codificadas pelos genes LIC11122 e LIC12287 já mostraram uma diminuição da reatividade com seu respectivo antissoro.

Figura 19 - Ensaio de acessibilidade das proteínas recombinantes por Proteinase K (PK). Em uma placa de ELISA foram imobilizadas 10^9 *Leptospira* (L1-130) por poço, previamente tratadas com 25 µg/ml de proteinase K em diferentes intervalos de tempo, 1, 2 e 4h. As amostras foram incubadas com os respectivos antissoros na diluição de 1:50 que por sua vez foram sondados pelo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. O antissoro contra DnaK na diluição 1:100 foi utilizada como controle. Brancos contendo todos os componentes da reação, exceto o antissoro contra recombinante, foram realizados em paralelo. As leituras foram feitas em 492 nm. As barras representam as médias das absorbâncias $\pm$ três desvios padrões para cada ponto e são representativas de dois experimentos independentes. Para análise estatística, os valores de DO obtidos para as leptospiros tratadas em tempos diferentes foi comparado com o das leptospiros não tratada (0h) pelo test *t* bicaudal (* $p < 0,05$).

Após 4 horas de incubação com PK, menos de 50% das proteínas foram detectadas. Em relação à DnaK, nenhuma redução significativa de sinal foi observada mesmo após 4 horas de incubação com PK. Dessa forma, podemos sugerir que as proteínas rLIC11122 e rLIC12287, são expressas na membrana da *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

4.8 Reatividade com soro de humanos diagnosticados com leptospirose e hamsters infectados experimentalmente

Tendo em vista uma maior detecção das proteínas rLIC11122 e rLIC12287 em cepas patogênicas virulentas, quando comparada com a cepa atenuada, resolvemos analisar se as proteínas são expressas durante o processo de infecção. Para isso, a reatividade das recombinantes foi avaliada com diferentes soros de hamsters e humanos infectados com *Leptospira*.

Soros de humanos pareados, correspondentes à fase inicial (MAT-) e a fase convalescente (MAT+) da leptospirose foram utilizados.

O *cutoff*, calculado a partir da reação das proteínas com amostra de *pool* soros de humanos saudáveis comercial (Sigma-Aldrich e Complement-Technology) foi de 0,1 e de 0,24 para Lsa19 e Lsa14, respectivamente. Sendo assim, a reatividade para a proteína a rLIC11122 de 63 % para MAT- e 55 % para MAT+, já para a proteína rLIC12287 foi de 20 % para MAT- e 35 % para MAT+ (Figura 20A e 20B). Vale a pena ressaltar a reatividade expressiva da rLIC11122 com soros MAT-, já que a detecção da leptospirose nessa fase inicial ainda representa um desafio.

Figura 20 - Reatividade dos soros de humanos diagnosticados com leptospirose com as proteínas rLIC11122 (A) e rLIC12287 (B). As proteínas foram imobilizadas em placa de ELISA (250 ng/poço) e incubadas com 20 soros pareados de pacientes diagnosticado com leptospirose, na fase inicial (MAT -) e convalescente (MAT +), na diluição de 1:200. A detecção da reatividade foi feita por incubação com anti-IgG humano conjugado com peroxidase (1:5000). Os respondedores são considerados aqueles acima do valor do *cutoff* (linha tracejada horizontal), definido como a média da reatividade das proteínas com *pool* de soros de humanos saudáveis, somada três vezes o desvio padrão.

A susceptibilidade dos hamsters à infecção por leptospirose os tornou animais modelos para estudo da doença (HAAKE, 2006). Resolvemos analisar a reatividade das recombinantes quanto a presença de IgG em amostras de soros de 44 hamsters infectados com a *Leptospira*. O cálculo do *cutoff* foi definido com base em 4 soros de hamsters não infectados (saudáveis), sendo para a rLIC11122 de 0,06 e de 0,07 para rLIC12287. O reconhecimento de anticorpos foi maior para a rLIC11122 com 43% respondedores, enquanto para a rLIC12287 apresentou 20% de respondedores (Figura 21).

A baixa reatividade apresentada pela rLIC12287 pode ser devido a sua baixa imunogenicidade, já que apresenta níveis de expressão superiores aos da rLIC11122 (MALMSTROM et al., 2009). Em conjunto, esses resultados sugerem que a proteínas selecionadas estão sendo expressas e participam em algum momento da infecção, e que a rLIC11122 pode ser importante para o reconhecimento de células imunológicas.

Figura 21 - Reatividade de soros de hamsters infectados com as proteínas recombinantes estudadas.

A porcentagem de respondedores para cada proteína foi determinada por ELISA, com 44 soros de hamsters (MAT+), na diluição de 1:200. A detecção da reatividade foi feita por incubação com anti-IgG de hamster conjugado com peroxidase (1:5000). Os respondedores são considerados aqueles acima do valor do *cutoff* (linha tracejada horizontal) definido como a média das absorvâncias obtidas para quatro pools de soros de hamsters saudáveis, somada a três vezes o desvio padrão. (A) rLIC11122 (cor cinza). (B) rLIC1228714 (cor Azul).

4.9 Adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular

A adesão às células hospedeiras é mediada por proteínas de membrana externa e consiste em uma das propriedades fundamentais no processo primário de colonização tecidual e disseminação da patogenicidade. Essa etapa do trabalho visa avaliar as características das proteínas recombinantes rLIC11122 e rLIC12287 quanto à sua capacidade de interação com componentes da MEC.

Para isso, imobilizamos um micrograma dos componentes da MEC em placa de microdiluição e incubamos com um micrograma de cada proteína recombinante, permitindo uma interação entre os componentes durante 2 horas a 37 °C. As proteínas ligadas foram detectadas adicionando o anticorpo contra cada proteína.

Os resultados apresentados na (Figura 22A) demonstram que ambas as proteínas foram capazes de interagir de forma significativa com laminina, quando comparado com os controles negativos BSA e fetuína. Para confirmar se de fato a ligação desse componente às proteínas recombinantes rLIC11122 e rLIC12287 é específica, anticorpos monoclonais antipoli-histidina foram utilizados (Figura 22B). Os resultados obtidos corroboram o anterior, mostrando que as proteínas recombinantes rLIC11122 e rLIC12287 são capazes de interagir de com a laminina.

Figura 22 - Adesão das proteínas recombinantes com os componentes da MEC. Placas de ELISA foram imobilizadas com 1 µg de laminina, colágeno tipo I e IV, fibronectina celular, elastina, vitronectina e com os controles negativos BSA e fetuína. Em seguida, 1 µg da proteína recombinante foi adicionado por poço e as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C. A detecção da adesão foi feita com (A) antissoro policlonal produzido contra cada proteína recombinante ou (B) anticorpo monoclonal antipoli-histidina. Os dados representam o valor da média das absorvâncias em 492nm $\pm$ desvio padrão de uma triplicata. Para análise estatística, a ligação das proteínas a cada componente foi comparada aos controles negativos, pelo teste t de *Student* (* $P < 0,05$).

Para definirmos a especificidade da ligação das proteínas recombinantes à laminina, um ensaio de dose-dependência foi realizado, no qual uma concentração fixa do componente imobilizado foi incubada com concentrações crescentes das proteínas recombinantes. Nota-se, (Figura 23A e 23B), que as proteínas Lsa19 (A) e Lsa14 (B) se ligaram de maneira dose-dependente e saturável à laminina. Os pontos em que a saturação foi atingida foram 10 µM para a Lsa19 e 1,0 µM para Lsa14. Assim, a constante de dissociação pode ser calculada e os valores obtidos das interações foram: rLIC11122 $K_D = 812 \pm 372,66$ nM e para a rLIC112287 $K_D = 51,7 \pm 44$ nM. A Lsa14 apresentou uma maior afinidade a lamina quando comparada a Lsa19, pois apresenta um K_D menor. A afinidade da proteína Lsa14 à laminina é da mesma magnitude de adesinas já descritas como, Lsa66, (OLIVEIRA et al., 2013) com $K_D = 53 \pm 15$ e Lsa77 que apresentou um $K_D = 55 \pm 17,5$ (TEIXEIRA et al., 2015). Já a Lsa19, quando comparada com adesinas já descritas, apresenta um K_D aproximado ao da Lsa26 com $K_D = 952 \pm 418$ (SIQUEIRA et al., 2013). Por terem, apresentado uma adesão de forma dose-dependente e saturável com a laminina, foram nomeadas de Lsa19 e Lsa14 (Leptospiral Surface Adhesin e com massa molecular aproximada em kDa).

Figura 23 - Especificidade da adesão das proteínas recombinantes à laminina. (A) Lsa19 e (B) Lsa14. O componente imobilizado foi incubado com concentrações crescentes da proteína recombinante. A detecção da ligação foi feita com anti-Lsa19 (1:2000) e anti-Lsa14 (1:2000), e em seguida, foi adicionado anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000). O BSA foi utilizado como controle negativo. Cada ponto foi feito em triplicata e está expresso como a média da absorbância $\pm$ desvio padrão de cada ponto.

Com o objetivo de detalhar a adesão das proteínas recombinantes à laminina foi avaliado se o bloqueio delas com o soro correspondente causaria alguma interferência na ligação. Para a proteína recombinante Lsa19 o efeito inibitório da ligação foi cerca de 80%, já para a Lsa14 foi mais de 60%, quando utilizado antissoro na diluição do soro 1:50. Soro pré-imune não interferiu na ligação, o que sugere que alguns epítomos imunogênicos estão localizados próximos do domínio de interação (Figura 24A e 24B).

Tendo em vista que as estruturas secundárias das proteínas estavam com conformação regular, resolvemos analisar a importância das mesmas na interação com a laminina. Para isso, as proteínas Lsa19 e Lsa14 foram aquecidas a 96 °C por 10 minutos, antes de serem incubadas com a laminina. O processo de desnaturação interferiu de forma significativa na interação com o componente avaliado apenas para a Lsa14, com diminuição da interação em aproximadamente 40%, como pode ser observado na (Figura 24 C). Esses resultados sugerem que a ligação da proteína Lsa14 à laminina depende de epítomos conformacionais, que são perdidos ao desnaturar a proteína, enquanto que para a Lsa19 a interação à laminina parece depender de epítomos lineares, pois a mesma não apresentou diminuição na interação com a laminina.

Figura 24 - Caracterização da ligação das proteínas recombinantes à laminina. (A) Lsa19 e (B) Lsa14, um micrograma de cada proteína recombinante foi incubado por 1 hora a 37 °C com diferentes diluições de antissoro correspondente (1:50 e 1:100) ou soro pré-imune (controle negativo) e então adicionado à placa de ELISA previamente imobilizada com 1µg de laminina. Em (C), a proteína foi desnaturada a 96 °C por 10 minutos antes de ser incubada com a laminina. A detecção da ligação foi feita com antissoro monoclonal antipoli-histidina, para todos os ensaios. Para análise estatística, a interação das proteínas recombinantes que sofreram algum tratamento prévio foi comparada, pelo teste t -Student, com sua interação sem terem sofrido algum tratamento (* $P < 0,05$).

A molécula de laminina é formada por três polipeptídeos arranjados assimetricamente por meio de pontes de dissulfetos e apresenta um alto teor de carboidratos entre 13% e 15% (FUJIWARA et al.,1988). Devido ao fato do reagente metaperiodato de sódio apresentar as propriedades de oxidar grupamentos hidroxil, presente nos carboidratos da laminina, sem prejudicar a estrutura da cadeia polipeptídica, o papel que esses carboidratos apresentam quanto à interação com as proteínas recombinantes pode ser analisado. Para isso, a laminina foi imobilizada em placa de microdiluição e incubada com concentrações diferente de metaperiodato (0 a 100 mM) por 1 hora. Em seguida, foi adicionado 1µg/poço de proteína recombinante, por 2 horas. A detecção foi feita utilizando o anticorpo monoclonal antipoli-histidina. Os resultados obtidos revelam que esses resíduos de açúcar participam do processo de ligação apenas para a proteína recombinante Lsa19, pois foi detectada diminuição na

interação da ligação em 74%, 60% e 62%, para as concentrações de 25, 50 e 100 mM de metaperiodato. Em relação a Lsa14, nenhuma diferença significativa com o controle (laminina sem o metaperiodato) foi observada no experimento realizado (Figura 25), sugerindo que os resíduos de açúcar podem não interferir da ligação.

Figura 25 - Envolvimento dos resíduos de açúcar da laminina em sua interação com as proteínas recombinantes. Um micrograma por poço de laminina foi incubada com concentrações crescentes de metaperiodato de sódio para oxidação dos resíduos de açúcar. Em seguida, foi adicionada a proteína recombinante (1 µg/poço) **Lsa19** (barra branca) e **Lsa14** (barra preta) e a interação prosseguiu por 2 horas. A detecção da ligação foi feita utilizando anticorpo monoclonal antipoli-histidina. Para análise estatística, os valores de porcentagem de ligação para cada concentração de metaperiodato foram comparados com a situação na qual a laminina não foi incubada com o agente oxidante (0 mM) por meio do teste t- *Student* (* $P < 0,05$).

Nosso grupo já descreveu proteínas recombinantes com a capacidade de interagir *in vitro* com componentes da matriz extracelular como Lsa20 (MENDES et al., 2011), Lsa66 (OLIVEIRA et al., 2011), Lsa33, Lsa25 (DOMINGOS et al., 2012), OmpL1 (FERNANDES et al., 2012), Lsa23, Lsa26, Lsa36 (SIQUEIRA et al., 2013), Lsa44, Lsa45 (FERNANDES et al., 2014); Lsa46, Lsa77 (TEIXEIRA et al., 2015), LIC10508 (SIQUEIRA et al., 2016). Os resultados obtidos revelam que as proteínas estudadas Lsa19 e Lsa14, assim como outras adesinas mencionadas anteriormente, podem atuar nos processos de invasão, evasão e colonização das leptospiros no sistema imune do hospedeiro.

4.10 Interações das proteínas recombinantes com componentes do plasma humano

Já foi descrita, a capacidade da *Leptospira* utilizar componentes do plasma como PLG, C4BP, fator H e fibrinogênio e alguns receptores proteicos, desta forma conseguem evadir do sistema imune do hospedeiro (BARBOSA et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2013; VERMA et

al., 2006; VIEIRA et al., 2009, 2011). O PLG, quando esta na sua forma ativa a plasmina na superfície da *Leptospira* pode degradar C3b e IgG, dessa forma é capaz de evadir sistema imune do hospedeiro (VIEIRA et al., 2009, 2011). Já foi descrita, a capacidade da *Leptospira* aderir a componentes reguladores como fator H e C4BP, Barbosa et al. (2009), Verma et al. (2006), Siqueira et al. (2013), os quais estão envolvidos na regulação do sistema complemento e interferem na regulação da C3 convertase, que atuam como cofator da serino-protease fator I na inativação proteolítica do C3b e C4b, obstruindo a formação da via clássica e alternativa do sistema complemento (BLOM, 2002; GIGLI; FUJITA; NUSSENZWEIG, 1979). Algumas proteínas de *Leptospira* estudadas pelo nosso grupo apresentaram a capacidade de adesão C4BP, são elas: Lsa33 e Lsa25 (DOMINGOS et al., 2012), Lsa30 (SOUZA et al., 2012) e Lsa23 (SIQUEIRA et al., 2013).

Outra molécula de adesão, utilizada pelas leptospiros é o fibrinogênio, que atua nas etapas finais de coagulação (CHOY et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2013; PINNE; CHOY; HAAKE, 2010) e algumas proteínas de superfície são capazes diminuir a formação do coágulo de fibrina (LIN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013).

Desta forma, decidimos avaliar se as proteínas poderiam interagir *in vitro* com componentes do plasma humano como plasminogênio (PLG), fibrinogênio, fibronectina plasmática e os reguladores do sistema complemento C4BP e fator H. Para isso, esses componentes foram imobilizados em placa de ELISA e incubados com as proteínas Lsa14 e Lsa19. Como pode ser observado na figura 26A, as proteínas estudadas foram capazes de interagir com o plasminogênio de forma estatisticamente significativa. Assim como para a laminina, confirmamos a interação das proteínas recombinantes Lsa19 e Lsa14, com o PLG utilizando o anticorpo monoclonal antipoli-histidina (Figura 26B).

Figura 26 - Adesão das proteínas recombinantes com os componentes do plasma. Placas de ELISA foram imobilizadas com 1 µg de plasminogênio, fator H, C4BP, fibrinogênio, Fibronectina Plasmática e com os controles negativos BSA e fetuína. Em seguida, 1 µg da proteína recombinante foi adicionado por poço e a placa foi incubada por 2 horas a 37 °C. A detecção da interação foi feita com (A) anticorpo policlonal produzido contra cada proteína recombinante ou (B) anticorpo monoclonal antipoli-histidina. Os dados representam o valor da média ± desvio padrão de uma triplicata. Para análise estatística, a ligação das proteínas a cada componente foi comparada aos controles negativos, pelo teste *t-Student* (* $P < 0,05$).

As interações entre as proteínas recombinantes e o PLG foram avaliadas por uma curva de dose resposta (Figura 27). Ligações dose-dependente foram observadas quando concentrações crescentes de proteínas recombinantes foram utilizadas e incubadas com uma concentração fixa do componente (1µg). Foi observada uma saturação para ambas as proteínas em 10µM, para Lsa19, e 1,5µM para Lsa14. Sendo que a Lsa14 apresentou uma maior afinidade, com constante de dissociação de $83,10 \pm 27,69$ nM (Figura 27 B). A Lsa19 apresentou uma menor afinidade, observado pelo seu $K_D = 1465,25 \pm 1051,40$ nM (Figura 27A). A afinidade da proteína Lsa14 ao PLG é da mesma relevância ao K_D descrito para a adesina Lsa32, com o $K_D = 81,5 \pm 31,1$ nM (DOMINGOS et al., 2015), e Lsa37 $K_D = 110,2 \pm 22,4$ nM (SILVA et al., 2016), enquanto que o K_D para a Lsa19 é próximo ao da Lsa20 (MENDES et al., 2011), que apresentou o $K_D = 1988 \pm 563$ nM. Esses resultados sugerem que as proteínas estudadas, podem ajudar na capacidade da *Leptospira*, capturar o plasminogênio do soro do hospedeiro e convertê-lo em plasmina utilizando os ativadores também do hospedeiro (VIEIRA et al., 2009). Com isso, a *Leptospira* dispõe de um grande poder de invasão, degradando componentes de matriz extracelular (fibronectina e laminina), e evasão imune com a degradação de efetores da resposta imune inata e adquirida (VIEIRA et al., 2011).

Figura 27 - Especificidade da interação das proteínas recombinantes ao PLG. Experimentos de dose-resposta da proteína recombinante Lsa19 (A) e da Lsa14 (B). O componente imobilizado foi incubado com concentrações crescentes da proteína recombinante. A detecção da ligação foi feita com antissoro anti-Lsa19 (1:2000) e anti-Lsa14 (1:2000), e em seguida, foi adicionado anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000). O BSA foi utilizado como controle negativo. Cada ponto foi feito em triplicata e está expresso como a média da absorbância $\pm$ desvio padrão de cada ponto.

A interação das proteínas recombinantes com o PLG humano também foi avaliada após elas serem bloqueadas com antissoro policlonal para cada recombinante e terem sido aquecidas a 96 °C por 10 minutos; o ensaio foi realizado da mesma forma como descrito para a laminina.

Os resultados sugerem que ambas as proteínas apresentam regiões imunogênicas que podem estar envolvidas nessas ligações (Figura 28A e 28B). Para a proteína recombinante Lsa19 o efeito inibitório da ligação foi cerca de 80%, já para a Lsa14 foi mais de 62%, na diluição do soro 1:50. Soro pré-imune não provocou nenhuma inibição significativa na interação das proteínas com o PLG. O processo de desnaturação das proteínas recombinantes também foi capaz de inibir a interação das mesmas com o PLG, como pode ser visualizado na (Figura 28C), sugerindo que os epítomos conformacionais tenham uma alta importância nessas interações.

Figura 28 - Caracterização da ligação das proteínas recombinantes ao PLG. Um micrograma de cada proteína recombinante foi incubado por 1 hora a 37 °C com diferentes diluições de antissoro (1:50 e 1:100) ou soro não-imune (controle negativo) e então adicionado à placa de ELISA previamente imobilizada com 1µg de PLG. **(A)** Lsa19, **(B)** Lsa14. Em **(C)** a proteína foi desnaturada a 96 °C por 10 minutos. A detecção da ligação foi feita com antissoro monoclonal antipoli-histidina para todos os ensaios. Para análise estatística, da interação das proteínas recombinantes que sofreram algum tratamento prévio foi comparado, pelo teste t-Student, com sua interação sem terem sofrido algum tratamento (* $P < 0,05$):-

Para avaliar a relevância da força iônica na interação da Lsa19 e da Lsa14 com PLG, foi realizado um ensaio de ligação utilizando tampão com diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl), variando de 50 (PBS1s) a 550 mM. Os dados demonstram uma redução de 56% na ligação de Lsa14 e PLG na presença de 150 mM de NaCl, perto da concentração fisiológica humana, alcançando uma redução de 69% na maior concentração de saturação de NaCl (550 mM) (Figura 29). O aumento da concentração de NaCl não teve efeito na ligação de Lsa19 de PLG (Figura 29). O fato de a ligação entre Lsa14 e o PLG diminuir significativamente em concentrações fisiológicas (120 mM) (CHOY et al., 2007) sugere que esta interação possa não ser relevante *in vivo*.

Figura 29 - Envolvimento das forças iônicas na ligação das proteínas recombinantes com o PLG. Um micrograma de proteína recombinante Lsa19 (barra branca) e Lsa14 (barra preta) foi imobilizado em placa de ELISA e em seguida incubado com um micrograma de PLG foi com concentrações crescentes de cloreto de sódio (50 a 550 mM). A detecção da ligação foi feita com anti-PLG (1:5000) seguida de incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Para análise estatística, os valores de porcentagem de ligação para cada concentração de NaCl foram comparados com a situação na qual o PLG foi incubado com a concentração mínima do sal (50 mM) por meio do teste t-Student (* $P < 0,05$).

Já está bem estabelecido na literatura que os domínios *kringle* presentes no PLG interagem com os resíduos de lisinas em receptores de uma ampla gama de bactérias (LAHTEENMAKI; KUUSELA; KORHONEN, 2001). Assim, como estas bactérias, as leptospiros também possuem a característica de interagir com o PLG via domínio *kringle*. Utilizando um análogo de lisina, ácido aminocapróico (ACA), foi possível observar a inibição da ligação entre a bactéria e o PLG (VIEIRA et al., 2009). A partir destes dados, fomos avaliar a participação dos resíduos de lisina das proteínas Lsa19 e Lsa14 na ligação com o PLG.

Ao adicionar concentrações crescentes de ACA junto com as proteínas recombinantes, foi possível observar uma diminuição da interação das proteínas recombinantes com o plasminogênio, já com 2 mM de ACA, sugerindo que a ligação entre estes se dá em grande parte via domínios *kringle* do PLG e os resíduos de lisina presentes na proteína (Figura 30). Esses resultados, vão de acordo com experimentos realizados pelo grupo que demonstram a participação desses domínios na ligação do PLG à *L. interrogans* (VIEIRA et al., 2009).

Figura 30 - Influência dos resíduos de lisina na ligação das proteínas recombinantes ao PLG. Um micrograma em cada poço de PLG foi imobilizado, e então foi adicionado 1µg/poço da **Lsa19** e da **Lsa14**, incubadas com diferentes concentrações de ácido aminocapróico (2 e 20 mM). Após interação, a detecção da ligação das proteínas ao PLG foi feita por meio da utilização de antissoro específico contra cada proteína, seguida de incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. A verificação da significância da redução foi feita por meio do teste t -*Student*, em comparação com a ligação da proteína ao PLG na ausência de ACA (0 mM) ($p < 0,05$).

4.11 Conversão do plasminogênio em plasmina

Como descrito anteriormente, a *Leptospira* é capaz de capturar o PLG presente no soro do hospedeiro, utilizando diversas proteínas descritas e transforma-lo em sua forma ativa plasmina, utilizando-se do ativador uroquinase do hospedeiro (FERNANDES et al., 2014; SOUZA et al., 2012; SIQUEIRA et al. 2016; TEIXEIRA et al., 2015; VIEIRA et al., 2010, 2011). A plasmina é uma serino protease de amplo espectro capaz de degradar diversos componentes da matriz extracelular, como laminina, fibronectina plasmática, colágeno tipo IV, e também é capaz de degradar imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento. Tal capacidade promove uma grande invasividade e a capacidade de evasão imune para esta bactéria (COLEMAM; BENACH, 1999; VIEIRA et al., 2009).

Assim, para verificar se o PLG ligado às proteínas recombinantes Lsa19 e Lsa14 gera atividade proteolítica, placas de ELISA foram adsorvidas com as respectivas proteínas recombinantes, em seguida bloqueadas, para posteriormente serem incubadas com PLG. Para que a reação ocorresse, um ativador de plasminogênio (uPA) foi adicionado juntamente com um substrato cromogênico específico para plasmina. A reação foi mantida por 16 horas e a atividade da plasmina foi medida indiretamente pela geração de cor (405 nm), resultante da degradação do substrato D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride. Como pode ser observado na

(Figura 31), o PLG ligado às proteínas recombinantes pode ser convertido em plasmina quando comparado com os grupos controles, onde um dos componentes do sistema foi omitido. Também não foi observada nenhuma atividade proteolítica significativa quando o BSA foi utilizado no lugar das proteínas recombinantes. Esses dados sugerem que as duas proteínas podem auxiliar a *Leptospira* a se tornar um organismo proteolítico capaz de invadir e evadir o sistema imune do hospedeiro.

Figura 31 - Avaliação da formação de plasmina. Em placa de ELISA foi imobilizado 1 µg de cada proteína recombinante por poço. As proteínas foram incubadas com 1 µg por poço de PLG durante 2h a 37 °C. Após a interação da proteína com o componente, foram adicionados o ativador plasminogênio (uPA) e um substrato cromogênico específico para plasmina (S). O Primeiro tratamento (PLG+uPA +S), para os demais retiramos um dos componentes para ser feito o controle negativo do experimento (PLG+uPA; PLG+uPA; PLG+S; S+uPA). BSA foi utilizado como controle negativo de ligação. Para análise estatística, a ligação da proteína aos componentes foi comparada com a ligação com o controle negativo pelo teste *t-Student* (* $P < 0,01$).

5 CONCLUSÕES

Os genes LIC10377, LIC11184, LIC12287 e LIC11122 , foram selecionados para o estudo com base na sua localização celular predita por ferramentas de bioinformática. Após a obtenção da análise predição obtida *in silico*. Sendo assim, para avaliar experimentalmente a possibilidade de as proteínas em estudo estarem expostas na superfície da leptospira realizamos metodologias distintas como, análise de bactérias intactas e proteínase K. E com base nos resultados obtidos às proteínas recombinante Lsa19 e Lsa14 podemos sugerir que ambas estão presentes na membrana externa da bactéria.

A reatividade com soros de humanos e hamsters infectados sugere que a proteína Lsa19 pode ser expressa durante o processo da infecção, pois, a mesma apresentou uma reatividade superior a 50% em todas as fases (MAT- e MAT+) dos soros testados. A proteína Lsa14 mostrou uma baixa reatividade, sugerindo que a mesma pode ser expressa em menor quantidade no processo infeccioso.

As proteínas foram capazes de interagir com o componente da MEC laminina de maneira dose dependente e saturável. Os dados sugerem uma possibilidade de as proteínas estudadas estarem envolvidas no processo de colonização e invasão de diversas espécies de *Leptospira* spp. A participação dos epítomos antigênicos contidos nas proteínas recombinantes estudadas foram analisados e os resultados sugem que os mesmos estão envolvidos na interação com a laminina, e o bloqueio desses sítios de ligação pode interferir no processo de colonização inicial da bactéria.

As proteínas também interagem com o PLG de forma dose dependente, sendo possível observar que o PLG que estava ligado às proteínas recombinantes foi convertido em plasmina, e desta forma, as proteínas Lsa19 e Lsa14 podem auxiliar a *Leptospira* a invadir o hospedeiro e a evadir o sistema imune do mesmo.

Podemos concluir que a *Leptospira* possui um vasto repertório de proteínas com a capacidade de adesão que provavelmente estão envolvidas na patogênese da bactéria. A caracterização das proteínas Lsa19 e Lsa14 como adesinas indicam sua provável participação no processo de colonização da bactéria. A presença de um factor sigma na superfície celular desempenhando um papel secundário, e provavelmente, mediando a interação hospedeiro-patógeno, sugere que a proteína expressa pelo gene LIC11122 possa ser uma proteína *moonlight*.

REFERÊNCIAS*

1

- ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- ADLER, H. et al. Prevalence of Leptospira spp. in various species of small mammals caught in an inner-city area in Switzerland. **Epidemiol. Infect.**, v. 128, n. 1, p. 107-109, 2002.
- 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.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- _____. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ATZINGEN, M. V. et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol.**, v. 8, p. 70, 2008.
- _____. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. **J. Infect.**, v. 59, n. 4, p. 264-276, 2009.
- BABER, M. D.; STUART, R. D. Leptospirosis canicola; a case treated with penicillin. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 2, n. 6426, p. 594-596, 1946.
- BARBOSA, A. S. et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 11, p. 6356-6364, 2006.
- _____. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 3, p. 1137-1143, 2009.
- BHANDARI, P.; GOWRISHANKAR, J. An Escherichia coli host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 13, p. 4403-4406, 1997.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.
- BLAST. National center for biotechnology information. Server. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 24 de out. 2016.
- BOON HINCKLEY, M. et al. A Leptospira interrogans enzyme with similarity to yeast Ste14p that methylates the 1-phosphate group of lipid A. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 34, p. 30214-30224, 2005.
- BRAMEL, R. G.; SCHEIDY, S. F. The effect of revaccination of horses and cattle with Leptospira pomona bacterin. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 128, n. 8, p. 399-400, 1956.
- BRANGER, C. et al. Protection against Leptospira interrogans sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 7, p. 4062-4069, 2005.

* De acordo com:

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

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: p. 87–94, 2004.

BRAUN, V., MAHREN, S. & OGIERMAN, M.. Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. **Cur. Opin. Microbiol.**, v. 6, 173-180, 2003.

BRENNER, D. J. et al. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 49 pt. 2, p. 839-858, 1999.

BRETT-MAJOR, D. M.; COLDREN, R. Antibiotics for leptospirosis. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 2, p. CD008264, 2012.

BULACH, D. M. et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, n.39, p.14560-14565, 2006.

CELLO: subcellular localization predictor. Version 2.5. Molecular bioinformatics center: 2006. Disponível em : <<http://cello.life.nctu.edu.tw/>>. Acesso em: 24 out. 2016.

CAPITO. Analysis and plotting tool for circular dichroism. Software. Disponível em: <<http://capito.nmr.fli-leibniz.de/index.php>>. Acesso em: 10 maio 2016.

CHAGAS-JUNIOR, A. D. et al. Detection and quantification of *Leptospira interrogans* in hamster and rat kidney samples: immunofluorescent imprints versus real-time PCR. **PLoS One**. v. 7, n. 2, p. e32712, 2012.

CHAPPEL, R. J. et al. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 12, p. 5484-5488, 2004.

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

CHEN, T. [Development and present status of a leptospiral vaccine and the technology of vaccine production in China]. **Nihon Saikingaku Zasshi.**, v. 40, n. 4, p. 755-762, 1985.

CHOY H.A. et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infect.Immun.**, 75: 2441–2450. pmid:17296754 doi: 10.1128/iai.01635-06. 2007.

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

CLARK, R. G. et al. Recombinant human growth hormone (GH)-binding protein enhances the growth-promoting activity of human GH in the rat. **Endocrinology**, v. 137, n. 10, p. 4308-4315, 1996.

CLUSTALW2. The European bioinformatics institute, 2013. Server. Disponível. <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>>. Acesso em: 24 out. 2016.

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

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

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

CULLEN, P. A. et al. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 5, p. 2311-2318, 2002.

_____. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 8, p. 4853-4863, 2005.

CUMBERLAND, P.; EVERARD, C. O.; LEVETT, P. N. Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, v. 61, n. 5, p. 731-734, 1999.

D'ANDREA, A. et al. Comparison of two PCR methods for detection of *Leptospira interrogans* in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 107, n. 1, p. 85-88, 2012.

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. 2035-2039, 1984.

DE FOST, M. et al. Interleukin 12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with *Leptospira interrogans*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 10: 332-335. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/content/10/2/332>>. Acesso em 24 de março 2016.

DOMINGOS, R. et al. The novel *Leptospira interrogans* protein Lsa32 is expressed during infection and binds laminin and plasminogen. **Microbiol.**, v. 161, p. 151-164, 2015.

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

DINIZ, Mariana de Oliveira; FERREIRA, Luís Carlos de Souza. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estud. av.**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 19-30, 2010. <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010340142010000300003&lng=en&nrm=iso> . Access on 10 Oct. 2016.

ELLIS, T. M. et al. Detection of leptospires in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. **Aust. Vet. J.**, v. 60, n. 12, p. 364-367, 1983.

ELLIS, W. A. et al. Leptospiral infection in horses in Northern Ireland: serological and microbiological findings. **Equine Vet. J.**, v. 15, n. 4, p. 317-320, 1983.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiol.**, v. 5, n. 9, p. 1413-1425, 2010.

FAINE, S. et al., Eds. *Leptospira* and Leptospirosis. **MediSci. Melbourne, MediScied.**, Australia v. 2, p. 272, 1999.

FERNANDES, L. G. et al. Functional and immunological evaluation of two novel proteins of *Leptospira* spp. **Microbiol.** 2014. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.072074-0#tab>>. Acesso em: 25 março 2016.

_____. OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. **Infect. Immun.** v. 80, n. 10, p. 3679-3692, 2012.

- FINN, R. D. et al. Pfam: clans, web tools and services. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, n. p. D247-251, 2006.
- 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, 2016
- FUJIWARA S. et al. Structure and distribution of N-linked oligosaccharide chains on various domains of mouse tumour laminin. **Biochem. J.**, v. 252, p.453-461, 1988.
- 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. 305-313, 2005.
- GASTEIGER, J. Chemoinformatics: a new field with a long tradition. **Anal. Bio. Chem.**, v. 384, n. 1, p. 57-64, 2006.
- GAZI, I. F. et al. Leptospirosis is associated with markedly increased triglycerides and small dense low-density lipoprotein and decreased high-density lipoprotein. **Lipids.**, v. 46, n. 10, p. 953-960, 2011.
- GARDUÑO, R.A. et al. The *htpAB* operon of *Legionella pneumophila* cannot be deleted in the presence of the *groE* chaperonin operon of *Escherichia coli* **Can. J. Microbiol.**, Vol. 57, n. 11, p. 943-952, 2011.
- GELQUANT. AMPL software, 2003. Software.
- GENBANK. National center for biotechnology Information, U.S.A. National Library of Medicine. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/45600243> >. Acesso em: 10 maio 2016.
- GENERUNNER®. Version 3.01. Hasting software, Inc., 1994. Software. Disponível em: <<http://www.generunner.net/>>. Acesso em: 19 nov. 2014.
- GESSAIN, A. [Human retrovirus HTLV-1: descriptive and molecular epidemiology, origin, evolution, diagnosis and associated diseases]. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 104, n. 3, p. 167-180, 2015.
- GLICK B.R. et al. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, Washington, USA: Press, 2010.
- GOUVEIA, E. L. et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerg. Infect., Dis.**, v. 14, n. 3, p. 505-508, 2008.
- GRIFFITHS, M. E.; HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K. Antimicrobial therapy of leptospirosis. **Curr. Opin. Infect Dis.**, v. 19, n. 6, p. 533-537, 2006.
- GUERREIRO, H. et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 8, p. 4958-4968, 2001.
- HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v. 146 pt. 7, p. 1491-1504, 2000.
- HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in Humans. **Cur. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 5, p. 387, 65-97, 2015.
- HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Leptospiral membrane proteins--variations on a theme? **Indian J. Med. Res.** v. 121, n. 3, p. 143-145, 2005.
- _____. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Mol. Microbiol.** 2010.

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

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Subclinical leptospirosis may impair athletic performance in racing horses. **Trop. Animal Heal. Produc.**, Edinburgh, v. 44, n.8, p.1927–1930, 2012.

HANSON, L. E.; TRIPATHY, D. N.; KILLINGER, A. H. Current status of leptospirosis immunization in swine and cattle. **J. Am. Vet. Med., Assoc.** v. 161, n. 11, p. 1235-1243, 1972.

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

HOAG, W. G.; BELL, W. B. An immunogenic agent for the protection of cattle against *Leptospira pomona*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 16, n. 60, p. 381-385, 1955.

JACKSON, L. A. et al. Outbreak of leptospirosis associated with swimming. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 12, n. 1, p. 48-54, 1993.

JEFFERY C.J. et al. MoonProt: a database for proteins that are known to moonlight. **Nucleic Acids. Res.**, v. 43, p. 277-82, 2015.

JOUGLARD, S. D. et al. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. **Can J. Microbiol.**, v. 52, n. 8, p. 747-752, 2006.

KATZ, A. R. et al. Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, n. 11, p. 1834-1841, 2001.

KALIL, J.; CUNHA-NETO, E.; GUILHERME, L. Novas estratégias de vacinas. **Gaz. Med. Bahia.** v. 78, n. 1, p.65-71, 2008.

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

KENNY B.; FINLAY B. B. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 92, p.7991–7995, 1995.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009.

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

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

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

LANGSTON, C. E.; HEUTER, K. J. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. **Vet. Clin. North Am Small Anim Pract.**, v. 33, n. 4, p. 791-807, 2003.

LA SCOLA, B. et al. Partial rpoB gene sequencing for identification of *Leptospira* species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 263, n. 2, p. 142-147, 2006.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. 302-305, 2012.

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

LI, C. et al. Spirochete periplasmic flagella and motility. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 2, n. 4, p. 345-354, 2000.

LI, X. et al. Body distribution of poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres with entrapped leptospira interrogans antigens following intravenous and oral administration to guinea-pigs. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 52, n. 7, p. 763-770, 2000.

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

LIPOP. Version 1.0. Center for biological sequence analysis, 2015. Server. Disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>>. Acesso em: 24 out. 2016.

LIU, D. et al. PCR detection of pathogenic Leptospira genomospecies targeting putative transcriptional regulator genes. **Can. J. Microbiol.**, v. 52, n. 3, p. 272-277, 2006.

LJUNGH, A.; MORAN, A. P.; WADSTRÖM, T. Interactions of bacterial adhesins with extracellular matrix and plasma proteins: pathogenic implications and therapeutic possibilities. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 16, n. 2, p. 117-126, 1996.

LOTTENBERG R., et al. Cloning, sequence analysis, and expression in Escherichia coli of a streptococcal plasmin receptor. **J. Bacteriol.**, v.174, p.5204–5210, 1992.

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

MARTINEZ, R. et al. [Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba]. **Rev. Panam Salud Publi.**, v. 15, n. 4, p. 249-255, 2004.

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. 1561-1563, 1999.

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

MCCLAIN, J. B. et al. Doxycycline therapy for leptospirosis. **Ann Intern. Med.**, v. 100, n. 5, p. 696-698, 1984.

MELO, C. B. et al. [Geographical distribution of leptospirosis in Aracaju, State of Sergipe from 2001 to 2007]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, n. 4, p. 475-480, 2011.

MENDES, R. S. et al. The novel leptospiral surface adhesin Lsa20 binds laminin and human plasminogen and is probably expressed during infection. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 11, p. 4657-4667, 2011.

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

MERIEN, F. et al. A rapid and quantitative method for the detection of Leptospira species in human leptospirosis. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 249, n. 1, p. 139-147, 2005.

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, p.289–298, 1996.

MORIEL, D. G. et al. Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 107, n. 20, p. 9072-9077, 2010.

MUTHUMANI K, WISE MC, BRODERICK KE, HUTNICK N, GOODMAN J, FLINGAI S, et al. HIV-1 Env DNA Vaccine plus Protein Boost Delivered by EP Expands B- and T-Cell Responses and Neutralizing Phenotype In Vivo. **PLoS One**, v. 8, e.84234, 2013.

MURRAY G. L., et al.. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. **Mol. Microbiol.**, V.78: P.701–709, 2010.

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

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

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

NASCIMENTO, A. L. et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 7, p. 2164-2172, 2004a.

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

NICODEMO, A. C. et al. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 56, n. 2, p. 181-187, 1997.

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

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

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

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

PALANIAPPAN, R. U.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Curr. Opin Infect. Dis.**, v. 20, n. 3, p. 284-292, 2007.

PANCHOLI V.; FISCHETTI V. A. α -Enolase, a Novel Strong Plasmin(ogen) Binding Protein on the Surface of Pathogenic Streptococci. **J. Bacteriol.**, 170:2618–2624, 1998.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; SIOZOPOULOU, V.; CHRISTOU, L.; AKRITIDIS, N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 12, p. 351-357, 2008.

PATTI, J. M.; HÖÖK, M. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. **Curr Opin Cell. Biol.**, v. 6, n. 5, p. 752-758, 1994.

PAUSA, M. et al. Serum-resistant strains of *Borrelia burgdorferi* evade complement-mediated killing by expressing a CD59-like complement inhibitory molecule. **J. Immunol.**, v. 170, n. 6, p. 3214-3222, 2003.

PFAM. Version 3.0. Sanger institute, 2016 . Server. Disponível em: <<http://pfam.xfam.org/>>. Acesso em: 24 out. 2016.

PICARDEAU, M. Conjugative transfer between *Escherichia coli* and *Leptospira* spp. as a new genetic tool. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 1, p. 319-322, 2008.

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

PICARDEAU, M. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. Médecine et Maladies Infectieuses. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 46, e. 4, p. 245–252, 2013.

PINNA, M. at al. Seropositivity to *Leptospira interrogans* serovar Bratislava associated to reproductive problems without significant biochemical or hematological alterations in horses. **Ciênc. Rural, Santa Maria**, v.40, n.10, p.2214-2217, 2010.

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

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes. Infect.**, v. 2, n. 10, p. 1265-1276, 2000.

PROMEGA technical manual: pGEM-T and pGEM-T Easy vector Systems. USA: 2016.

PROTPARAM. Swiss institute of bioinformatics, 2005. Server. Disponível em : ><http://web.expasy.org/protparam/>>. Acesso em 24 de out. 2016.

PSORT prediction. 1999. Disponível em: <<http://psort.hgc.jp/>>. Acesso e m 24 de out. 2016.

QUE-GEWIRTH, N. L. et al. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *leptospira interrogans* lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 24, p. 25420-25429, 2004.

RANJBAR, B. AND GILL, P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. **Chem. Biol. & Drug Design**, v.74: pag. 101–120, 2009.

RADOSTITS, O.M. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. **Clínic. Vet.**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9 ed., p. 737, 2002.

RAMOS, C. R. et al. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 8, p. 1103-1109, 2004.

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

- _____. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. **Vaccine.**, v. 19, n. 17-19, p. 2688-2691, 2001.
- REITSTETTER, R. E. Development of species-specific PCR primer sets for the detection of *Leptospira*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 264, n. 1, p. 31-39, 2006.
- REN, S. X. et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature.** v. 422, n. 6934, p. 888-893, 2003.
- RICALDI, J.N. et al. Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into Leptospiral evolution and pathogenicity. **PLoS Negl. Trop. Dis.** Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001853>>. Acesso em: 20 out. 2016.
- RISTOW, P. et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathog.**, v. 3, n. 7, p. 97, 2007.
- ROMERO, E. C.; YASUDA, P. H. Molecular characterization of *Leptospira* ssp. strains isolated from human subjects in Sao Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 101, n. 4, p. 373-378, 2006.
- SAKATA, E. E. et al. [The serovars of *Leptospira interrogans* isolated from cases of human leptospirosis in Sao Paulo, Brazil]. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** v. 34, n. 3, p. 217-221, 1992.
- SARKAR, J. et al. Leptospirosis: a re-emerging infection. **Asian. Pac. J. Trop. Med.**, v. 5, n. 6, p. 500-502, 2012.
- SCHREIER, S. et al. Leptospirosis: current situation and trends of specific laboratory tests. **Expert Rev. Clin. Immunol.**, v. 9, n. 3, p. 263-280.
- SCHULTZ, J. et al. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. **Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.** v. 95, n. 11, p. 5857-5864, 1998.
- SEGURA, E. R. et al. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, n. 3, p. 343-351, 2005.
- SEHGAL, S. C. Leptospirosis on the horizon. **Natl. Med. J., India**, v. 13, n. 5, p. 228-230, 2000.
- SEHGAL, S. C. et al. Lai-like leptospira from the Andaman Islands. **Natl. Med. J., India**, v. 112, p. 135-139, 2000.
- SETTE, A.; RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 530-541, 2010.
- SETUBAL, J.C. et al. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. **Microbiology**, v.152. n. Pt 1, p.113-121, 2006.
- SIGNALP. Version 4.1. Center for biological sequence analysis, 2016. Server. Disponível em : <<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>> . Acesso em: 24 out. 2016.
- SILVA, L. P. et al. Evaluation of two novel leptospiral proteins for their interaction with human host components. **Pathog. Dis.**, v. 74, n. 5, 2016.
- SIQUEIRA, G. H. et al. Characterization of Three Novel Adhesins of *Leptospira interrogans*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.89, n.6 p. 1103-1116, 2013.

_____. The recombinant LIC10508 is a plasma fibronectin, plasminogen, fibrinogen and C4BP-binding protein of *Leptospira interrogans*. **Pathog. Dis.**, v. 74, n. 2, 2016.

SMART 2014. Server. Disponível em: < <http://smart.embl-heidelberg.de>>. Acesso em: 24 de out. 2016.

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

SPICHLER, A. et al. Using death certificate reports to find severe leptospirosis cases, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, n. 10, p. 1559-1561, 2007.

TAKAFUJI, E. T. et al. An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. **N Engl. J. Med.**, v. 310, n. 8, p. 497-500, 1984.

TASSINARI, W. S. et al. Distribuição espacial da leptospirose no Município do Rio de Janeiro, Brasil, ao longo dos anos de 1996-1999. **Cad. Saúde Púb.** v. 20, ed. 6, p. 1721-9, 2004.

TEIGLAND, M. B. An experience with a *Leptospira Pomona* bacterin in dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 129, n. 6, p. 259-260, 1956.

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.

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

TOYOKAWA T, Ohnishi M, Koizumi N. Diagnosis of acute leptospirosis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 9, p. 111-21, 2011.

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

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

TURNER, L. H.; MOHUN, A. F. Leptospirosis. **Br. Med. J.**, v. 1, n. 5693, p. 433-434, 1970.

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

_____. Differential cytokine gene expression according to outcome in a hamster model of leptospirosis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000582>>. Acesso em: 23 out. 2016.

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

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

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

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

VIJAYACHARI, P.; wang, S. C. Recent advances in the laboratory diagnosis of leptospirosis and characterisation of leptospires. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 24, n. 4, p. 320-322, 2006.

_____. Immunogenicity of a novel enhanced consensus DNA vaccine encoding the leptospiral protein LipL45, **Hum. Vacc. Immun.** v. 11, n. 8, p. 1945-1953, 2015.

VINETZ, J. M. A mountain out of a molehill: do we treat acute leptospirosis, and if so, with what? **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, n. 12, p. 1514-1515, 2003.

WANG, L. S. et al. Leptospirosis with transient paraparesis and thrombocytopenia: a case report. **J Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 45, n. 1, p. 75-78, 2012.

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

WATT, G. et al. The rapid diagnosis of leptospirosis: a prospective comparison of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test at different stages of illness. **J. Infect. Dis.**, v. 157, n. 4, p. 840-842, 1988.

WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 4, p. 346-352, 2001.

WIEDEMANN, C.; BELLSTEDT, P.; GORLACH, M. CAPITO--a web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data. **Bioinformatics**, v. 29, n. 14, p. 1750-1757, 2013.

WONGSRICHANALAI, C. et al. Co-infection with malaria and leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, n. 5, p. 583-585, 2003.

YAN, W. et al. Identification and characterization of OmpA-like proteins as novel vaccine candidates for Leptospirosis. **Vaccine**, v. 28, n. 11, p. 2277-2283, 2010.

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

YANG, C. W. Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by Toll-like receptors. **Kidney Int.**, v. 72, n. 8, p. 918-925, 2007.

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

YU, N. Y. et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**, v. 26, n. 13, p. 1608-1615, 2010.