PRISCILA ROMERO MAZZINI PEREIRA

Caracterização imunogênica e funcional de duas lipoproteínas preditas de *Leptospira interrogans* expressas em *Escherichia coli*

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

PRISCILA ROMERO MAZZINI PEREIRA

Caracterização imunogênica e funcional de duas lipoproteínas preditas de *Leptospira interrogans* expressas em *Escherichia coli*

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: Dra. 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)

Pereira, Priscila Romero Mazzini.
Caracterização imunogênica e funcional de duas lipoproteínas preditas de *Leptospira interrogans* expressas em *Escherichia coli.* / Priscila Romero Mazzini Pereira; 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. Lipoproteínas. 4. 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): Priscila Romero Mazzini Pereira

Titulo da Dissertação: Caracterização imunogênica e funcional de duas lipoproteínas preditas de *Leptospira interrogans* expressas em *Escherichia coli*

Orientador: Dra. Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento

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

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

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

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

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

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **721/15** referente ao projeto intitulado: "*Caracterização imunogênica e funcional de duas lipoproteínas preditas de Leptospira interrogans expressas em Escherichia coli*" sob a responsabilidade de **Priscila Romero Mazzini Pereira,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 24 de março de 2015.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Caracterização imunogênica e funcional de duas lipoproteínas preditas de *Leptospira interrogans* expressas em *Escherichia coli*", **protocolo nº 1372/15**, sob a responsabilidade de Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento e Priscila Romero Mazzini Pereira – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 18/3/2015.

This is to certify that the proposal "Immunological and functional characterization of two predict lipoproteins of Leptospira interrogans expressed in the host Escherichia coli", **protocol nº 1372/15**, under the responsibility of Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento and Priscila Romero Mazzini Pereira – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 3/18/2015. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 04/2015 - 03/2017	**Nº de animais/espécie**
Centro de Biotecnologia	60 Camundongos Balb/c 18-20g (F); 9 Hamsters 80g (F)

São Paulo, 24 de março de 2015

Dra. Wafa H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

Aos meus amados pais,

Decio e Claudia

Agradecimentos

À Deus,

que mesmo me dando entraves, incrivelmente me proporcionou a capacidade para superá-los...

À minha orientadora, Dra. Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento, por sempre ter sido prontamente atenciosa, proporcionar cada vez mais um ambiente de aprendizagem e acreditar no meu trabalho. É uma honra ser sua orientada, te admiro pela sua sabedoria e experiência.

Ao meu coorientador, Luis Guilherme V. Fernandes, por toda a paciência e por toda incansável instrução na rotina do laboratório, pelo apoio, companhia nos congressos e pelas inúmeras dúvidas sanadas.

À minha orientadora da iniciação científica, Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui, que me iniciou pelos caminhos da ciência e sempre me deu apoio tanto na pesquisa quanto na minha vida. Lembranças inesquecíveis!

À minha família Decio, Claudia, Luiz Felipe, Cristhina, Beatriz e meus avós Decio, Neusa e Leide, tios e primos que sempre me apoiaram de todas as formas e não cansaram de colocar pra frente quando eu mais precisei. Inclusive minha prima Helô.

Ao meu noivo Vilmar, que todos os dias me incentivou, sugeriu ideias para dias cada vez melhores e me fez ver o mundo com novos olhos.

À minha madrinha Madre Maria Lúcia pelas orações e pelos ensinamentos.

Aos amigos e colegas do laboratório Dra. Aline, Jupciana, Maria Fernanda, Amanda, Leandro, Dra. Mônica, Lucas, Fernanda e Dra. Gabriela por todos os momentos de discussões científicas e também pelos momentos de descontração, que tornaram o ambiente de trabalho muito agradável, com muita alegria.

Ao Jadson, estagiário de iniciação científica, que contribuiu grandemente para o meu aprendizado, pois me fez aprender a ensinar.

À todos meus amigos que sempre me incentivaram na minha carreira como Patrícia (Kone), Priscila (Neusa), Clarissa, Cinthia, Fernanda e Débora.

À equipe do Dr. Silvio A. Vasconcelos: Antônio Souza Filho, Gisele O. Souza. Pela colaboração nos trabalhos com a doação das cepas de leptospira.

À Dra. Eliete C. Romero pela doação dos soros de pacientes acometidos de leptospirose.

Ao Dr. Enéas de Carvalho pelos ensaios de dicroísmo circular e pela orientação no estágio prévio.

Às funcionárias da secretaria de biotecnologia Eliane e Fábia sempre muito atenciosas.

Ao Dr. Henrique K. Roffato e Alexsander S. Souza pelo auxilio no uso do microscópio confocal.

À todos os professores que fizeram parte das minhas bancas, tanto de qualificação quanto a de defesa, pois contribuíram muito para meu aprendizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2015/02590-5, pela bolsa de mestrado e financiamento do projeto juntamente com o CNPq e com a Fundação Butantan.

Muito Obrigada!

"O correr da vida embrulha tudo.

A vida é assim: esquenta e esfria,

aperta e daí afrouxa,

sossega e depois desinquieta.

O que ela quer da gente é coragem."

Guimarães Rosa

RESUMO

PEREIRA, P. R. M. **Caracterização imunogênica e funcional de duas lipoproteínas preditas de *Leptospira interrogans* expressas em *Escherichia coli.*** 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A leptospirose é uma zoonose de importância global e a maior causa de perdas econômicas no agronegócio, com aproximadamente 1 milhão de casos por ano em todo o mundo. Em áreas urbanas, os roedores desempenham o papel de principais reservatórios da doença por possibilitarem a colonização das leptospiras nos túbulos renais proximais e as excretarem vivas na urina. Não há vacina eficaz até o momento. A identificação de proteínas da membrana externa conservadas entre cepas patogênicas é o principal alvo de pesquisa para elucidar os mecanismos de patogenicidade. Estas proteínas, provavelmente, estão envolvidas na interação das leptospiras com o ambiente externo, podendo também servir de alvo para o sistema imune do hospedeiro. Dentre estas, a classe das lipoproteínas é uma das mais importantes, sendo de grande interesse para o desenvolvimento de novas vacinas e diagnóstico. O projeto propõe: a clonagem e expressão de duas lipoproteínas preditas, identificadas por bioinformática no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, empregando *Escherichia coli* como sistema hospedeiro de expressão; a caracterização das estruturas por dicroísmo circular; a avaliação da conservação das proteínas nativas nas diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* spp.; a determinação da localização das proteínas nativas na bactéria; a caracterização da interação das proteínas recombinantes com componentes do tecido e plasma do hospedeiro. Os genes foram amplificados sem o peptídeo sinal e as proteínas recombinantes foram expressas nas cepas de *E. coli*, na forma de corpúsculo de inclusão. Após renaturação e purificação, as análises de dicroísmo circular mostraram que as proteínas possuem estrutura secundária. As proteínas codificadas pelos genes mostraram-se conservados nas espécies patogênicas e ausente na saprofítica. A proteína do gene LIC13059 foi avaliada como de membrana externa assim como o dímero da LIC10879 no ensaio de proteinase K. As proteínas recombinantes foram reconhecidas por soro de indivíduos infectados, sugerindo a expressão delas durante a infecção. Mostraram interação com plasminogênio, fibrinogênio e laminina. Devido a ligação a laminina ser dose-dependente e saturável, a rLIC13059 e rLIC10879 foram nomeadas Lsa25.6 e Lsa16 (***L**eptospiral **S**urface **A**dhesin*, seguido de suas respectivas massas moleculares em kDa). A interação Lsa25.6-fibrinogênio foi capaz de inibir em aproximadamente 80% a formação de coágulo de fibrina. Somente a Lsa16 apresentou interação com a e-caderina, um receptor de celular de mamíferos. Esses resultados indicam que estas proteínas podem estar envolvidas no processo de colonização e invasão do hospedeiro pela leptospira. A interação da proteína Lsa25.6 com o fibrinogênio e a subsequente inibição do coágulo de fibrina pode sugerir o envolvimento da proteína em focos hemorrágicos associado a leptospirose severa. Já a alta afinidade pelo plasminogênio, tanto purificado como recrutado do soro humano, mostrou-se capaz de ligar esse componente e ajudar a leptospira se tornar um organismo proteolítico, evadindo o sistema imunológico e atingindo sítios secundários de colonização.

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

ABSTRACT

PEREIRA, P. R. M. **Immunogenic and functional characterization of two probable lipoproteins of *Leptospira interrogans* expressed in *Escherichia coli.*** 2016. 96 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Leptospirosis is the most widespread zoonosis and also a major cause of economic loss in animal production worldwide. It has been considered a major emerging infectious disease in the last ten years and it is included in the list of Neglected Tropical Diseases, according to the World Health Organization, with approximately 1 million cases per year worldwide. In urban areas, rodents are the main reservoirs of the disease; leptospires colonize the proximal renal tubules and are excreted live in urine. To date, there is no effective vaccine. The identification of outer membrane proteins, conserved among pathogenic strains, is the main focus of research to elucidate the mechanisms of pathogenicity. These proteins probably mediate the interaction of leptospires with the external environment, and can also serve as targets for the host immune system. The study of surface antigens, not yet described in *Leptospira interrogans* literature, is intriguing and may indicate an unprecedented knowledge in the initial pathogen-host interactions. It also represents new alternatives in the search for prophylactic or serodiagnosis candidates. The project proposed: cloning and expression of two predicted lipoproteins, encoding by the LIC13059 and LIC10879 genes, identified by bioinformatics the genome sequences of *L. interrogans* serovar Copenhageni; Structural characterization by circular dichroism; evaluation of the presence and conservation of the native proteins in different species and serovars of *Leptospira* spp.; determining the location of the native proteins in bacteria; characterization of the recombinant proteins interacting with tissue and plasma components of the host. The genes were amplified without the signal peptide and the recombinant proteins were expressed in *Escherichia coli*, in insoluble form, as inclusion bodies. After refolding and purification, circular dichroism analysis showed that the proteins have secondary structure. The proteins encoded by the genes are shown to be conserved in the pathogenic strains and absent in saprophytic one. The LIC13059 protein was assessed as surface exposed as well as the dimer form of LIC10879 in the assay of proteinase K. The two recombinant proteins were recognized by confirmed humam leptospirosis serum samples, suggesting that they are expressed during the infection. Recombinant proteins interact with plasminogen, fibrinogen and laminin. Because of the bind with laminin in a dose-dependent and saturable manner, the rLIC13059 and rLIC10879 were named Lsa25.6 and Lsa16 (***L**eptospiral **S**urface **A**dhesin*, followed by their respective molecular masses), respectively. In addition, the protein Lsa16 interacted with e-cadherin, a mammalian cell receptor. These two recombinant proteins are able to recruit plasminogen from the normal human serum. The plasminogen captured by both recombinant proteins could be converted into plasmin, a mechanism that could help bacterial penetration in the host. Both proteins interacted with fibrinogen but only Lsa25.6 was capable of inhibiting the formation of fibrin clot. Our data suggest that these novel proteins may participate in *Leptospira*-host interactions and pathogenesis.

Keywords: *Leptospira*. Leptospirosis. Lipoproteins. Recombinant proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Leptospiras no ambiente e no hospedeiro.. 20

Figura 2 – Classificação taxonômica de espiroquetas de importância médica. 22

Figura 3 – Representação esquemática básica da ativação da fibrinólise e inibição da coagulação seguido da ligação de PLG e Fb por *Leptospira.* 30

Figura 4 - Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy.. 39

Figura 5 - Mapa do vetor de expressão pAE.. 41

Figura 6 - Filogramas obtidos pelo software Clustal Omega por alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos.. 58

Figura 7 - Análise dos genes de interesse em gel de agarose 1%, após amplificação. 59

Figura 8 - Análise dos fragmentos de DNA após ensaio de restrição das construções pAE/Insertos em gel de agarose 1%. 60

Figura 9 - Análise da expressão das proteínas recombinantes em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. 61

Figura 10 - Ensaio de *Western blotting* das proteínas recombinantes utilizando anticorpo anti-his. 61

Figura 11 - (A) Análise das proteínas recombinantes purificadas por SDS-PAGE..... 63

Figura 12 - Produção de IgG pela imunização de camundongos BALB/c com as proteínas recombinantes.. 65

Figura 13 - Avaliação das respostas celulares apresentada pelos camundongos imunizados com as proteínas recombinantes.. 66

Figura 14 - Reatividade de soro de pacientes diagnosticados com leptospirose com as proteínas recombinantes 67

Figura 15 - Detecção da proteína nativa em extratos de *Leptospira* spp.. 68

Figura 16 - *Western Blotting* para avaliação da acessibilidade da PK..... 69

Figura 17 - Ensaio de ELISA de bactéria intacta detectado com antissoro contra cada proteína recombinante. . 70

Figura 18 - Avaliação da interação das proteínas recombinantes com componentes da matriz extracelular e componentes do soro. 73

Figura 19 - Curvas de dose-resposta da ligação das proteínas recombinantes aos componentes Laminina, Plasminogênio, Fibrinogênio e E-caderina.. 75

Figura 20 – Participação dos resíduos de carboidratos da laminina na ligação com as proteínas recombinantes.. 77

Figura 21 - Influência dos resíduos de lisina na ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio..... 78

Figura 22 - Geração de plasmina pela ativação do plasminogênio ligado às proteínas recombinantes. 79

Figura 23 - As proteínas recombinantes recrutam PLG de forma dose-dependente.. 80

Figura 24 - Inibição do coágulo de fibrina pelas proteínas recombinantes.. 82

Figura 25 - Avaliação dos epítopos imunogênicos e da conformação estrutural das proteínas recombinantes na ligação com os diferentes componentes. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de oligonucleotídeos empregada para amplificação dos genes. 38

Tabela 2 - Resumo da análise por bioinformática. 56

Tabela 3 - Massa molecular e pI teórico das proteínas recombinantes. 61

Tabela 4 - Análise dos espectros de CD pelo programa CAPITO. 63

Tabela 5 - Constantes de dissociação (K_D) das proteínas recombinantes e ligantes. 75

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs - Absorbância

ACA - Ácido Aminocapróico

Anvisa – agência nacional de vigilância sanitária

BSA - Albumina de soro bovino

Brdu - Bromodesoxiuridina

CAM - *Cell adhesion molecules*

C4BP - C4 *binding protein* (proteína ligante de C4)

CD - Dicroísmo Circular

cDNA – DNA complementar

ConA - Concanavalina A

Da - Dalton

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeo

DO - Densidade óptica

EDTA - Ácido etilenodiamino tetracético

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EMJH - Meio de Cultura Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris

Fb - Fibrinogênio

Fiocruz - Fundação Osvaldo Cruz

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

His - Histidina

IFN - Interferon

Ig - Imunoglobulina

IPTG - Isopropil-â-tiogalactosídeo

Kb - Quilobase

LB - Meio Luria-Bertani contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de triptona e 1% de NaCl

Len – *leptospiral endostatin-like*

Lig - *Leptospiral imunoglobullin-like*

LPHS - Síndrome pulmonar hemorrágica associada à leptospirose

Lsa - *Leptospiral surface adhesin*

LPS - Lipopolissacarídeo

MAT - Teste de microaglutinação

Mb – Mega pares de base

MEC - Matriz extracelular

OMP – *Outer-membrane protein* (proteína de membrana externa)

OMS - Organização mundial de saúde

OPD - o-fenilenodiamina

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

pI – ponto isoelétrico

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

PLG - Plasminogênio

PMSF - Fenilmetilsulfonilfluor

RBS - Sítio de ligação ao ribossomo

RNA - Ácido ribonucleico

RNAm – RNA mensageiro

RPM – Rotação por minuto

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*

TLR – *Toll-like receptor*

TNF - Fator de necrose tumoral

tPA – Ativador de plasminogênio do tipo tecidual

uPA - Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase

X-gal – 5-bromo-4-cloro-indolil-â-D-galactopiranosideo

Sumário

1 INTRODUÇÃO 20

1.1 O Gênero Leptospira 20

1.2 Taxonomia e classificação 21

1.3 A doença: leptospirose 22

1.4 Leptospirose no Brasil 24

1.5 Diagnóstico e tratamento 25

1.6 A Patogenicidade de *Leptospira* spp. 27

1.7 Vacina contra leptospirose 30

1.8 Genômica funcional de *Leptospira* spp. 32

2 OBJETIVOS 34

2.1 Objetivos gerais 34

2.2 Objetivos específicos 35

3 MATERIAL E MÉTODOS 35

3.1 Cepas de bactérias 35

3.1.1 Leptospira 36

3.1.2 Escherichia coli 36

3.2 Soros de pacientes acometidos com leptospirose 36

3.3 Componentes biológicos 37

3.4 Análise por bioinformática 37

3.5 Extração de DNA genômico de *Leptospira* spp. 38

3.6 Amplificação das sequências de interesse 38

3.7 Subclonagem no vetor pGEM-T Easy 39

3.8 Clonagem no vetor de expressão pAE 40

3.9 Sequenciamento das construções pAE/inserto 41

3.10 Expressão das proteínas recombinantes 42

3.11 Purificação e diálise das proteínas recombinantes 43

3.12 Análise da estrutura das proteínas recombinantes por Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) 44

3.13 Preparação do extrato de *E. coli* 44

3.14 Imunização de camundongos para obtenção de antissoros policlonais antiproteína recombinante 44

3.15 Titulação de anticorpos por ELISA 45

3.16 Avaliação da resposta celular 46

3.17 Detecção de anticorpos IgG e IgM em soros de pacientes diagnosticados com leptospirose em fase inicial e fase convalescente da doença 47

3.18 Preparo dos extratos proteicos de *Leptospira* spp. 47

3.19 Separação das proteínas por Western-blotting 47

3.20 Ensaios de localização das proteínas nativas na bactéria 48

3.20.1 Acessibilidade à proteínase K (PK) 48

3.20.2 ELISA de bactéria intacta 49

3.21 Ensaios de interação aos componentes do hospedeiro 49

3.21.1 Ensaio de interação das proteínas recombinantes aos componentes da matriz extracelular e plasma 49

3.21.2 Curva de dose-resposta da ligação das recombinantes aos componentes 50

3.21.3 Caracterização da ligação das recombinantes à laminina 50

3.21.4 Caracterização da ligação das recombinantes ao plasminogênio 51

3.21.5 Ensaio de atividade enzimática da plasmina 51

3.21.6 Recrutamento de plasminogênio a partir do soro humano 52

3.21.7 Inibição do coágulo de fibrina 52

3.21.8 Avaliação dos epítopos imunogênicos e da conformação estrutural das proteínas recombinantes na ligação com os diferentes componentes 53

3.22 Teste de aglutinação microscópica (MAT) 53

3.23 Análises estatísticas 54

3.24 Comitê de Ética animal e humano 54

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 55

4.1 Análise de bioinformática dos genes selecionados 55

4.2 Análise da presença dos genes entre as diversas espécies e sorovares de *Leptospira* 56

4.3 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes 59

4.4 Expressão das proteínas recombinantes 60

4.5 Purificação, diálise e análise da estrutura secundária das proteínas recombinantes 62

4.6 Avaliações imunológicas 64

4.7 Reatividade da proteína recombinante com soro de pacientes 66

4.8 Presença das proteínas em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* spp. 67

4.9 Ensaios de localização 68

4.9.1 Acessibilidade à proteínase K (PK) 68

4.9.2 ELISA de bactéria intacta para detecção de antígeno na superfície 70

4.10 Ensaios com componentes do hospedeiro 70

4.10.1 Interação das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular (MEC), plasma e receptor de célula de hospedeiro 71

4.10.2 Curva de dose-resposta 74

4.10.3 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes à laminina 76

4.10.4 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio *77*
4.10.5 Conversão do plasminogênio à plasmina *78*
4.10.6 Proteínas recombinates recrutam plasminogênio a partir do soro humano *80*
4.10.7 Inibição do coágulo de fibrina pelas proteínas recombinantes *81*
4.10.8 Avaliação dos epítopos imunogênicos e da conformação estrutural das proteínas recombinantes na ligação com os diferentes componentes *83*
5 CONCLUSÕES **85**
REFERÊNCIAS **86**

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Gênero Leptospira

O gênero *Leptospira* pertence à família *Leptospiracea* e à ordem *Spirochaetales*. São bactérias Gram-negativas, com membrana celular dupla e presença de lipopolissacarídeos (JACKSON et al., 1993), no entanto apresentam uma característica de bactéria Gram-positiva, a qual a membrana plasmática apresenta forte associação com a parede celular, composta de peptideoglicanos. Apresentam formato alongado e espiralado de 6 até 20 µm de comprimento e 0,1 µm de diâmetro. A visualização das leptospiras se dá por microscopia de campo escuro ou contraste de fase, dificilmente são coradas pela técnica de Gram e podem ser impregnadas por prata pelo método de Fontana-Tribondeau (FAINE et al., 1999).

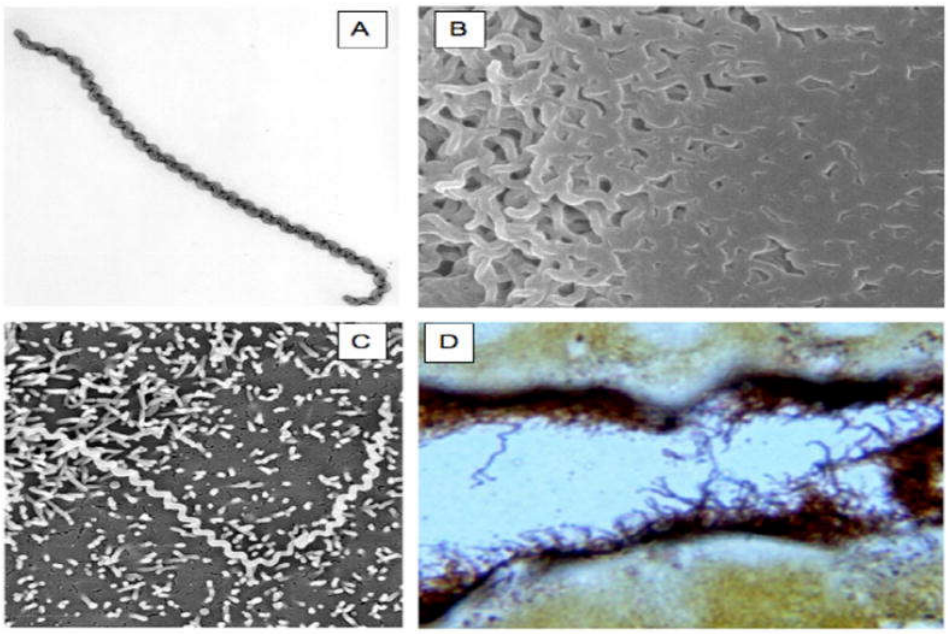


Figura 1 – Leptospiras no ambiente e no hospedeiro. (A) Leptospiras são bactérias finas e helicoidais. (B) Micrografia eletrônica de varredura de biofilme de *L. interrogans* sobre superfície de vidro. (C) Micrografia eletrônica de varredura de *L. interrogans* aderindo a monocamadas de células renais caninas Madin-Darby polarizadas. (D) Microfotografia de uma secção corada por Warthin-Starry de tecido renal de um rato de esgoto capturado (*Rattus norvegicus*). As leptospiras são vistas como estruturas filamentosas impregnadas de prata no interior do lúmen do túbulo renal proximal (aumento de 400x).
Fonte: (Ko; Goarant; Picardeau, 2009).

Essas bactérias contém dois flagelos periplasmáticos, os quais conferem forma e mobilidade relevante (PICARDEAU et al., 2008). Essa mobilidade está associada à fator de

virulência, visto que bactérias recém isoladas possuem uma maior mobilidade quando comparadas com bactérias mantidas *in vitro* (JACKSON et al., 1993). São bactérias aeróbias obrigatórias com crescimento lento tanto em meio de cultura sólido quanto líquido, com tempo de geração variando entre 28 ºC e 30 ºC e entre pH 7,2 e 7,6 em meio suplementado com ácidos graxos de cadeia longa, vitaminas B1 e B12 e sais de amônio (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). O meio de cultura mais utilizado para cultivo *in vitro* é o Ellinghausen-McCullough/ Johnson-Haris (EMJH) com albumina sérica bovina como detoxificante e ácido oleico complexado à polissorbato como fonte de carbono. Apesar de apresentar em seu genoma genes completos do metabolismo do glicerol e da via glicolítica (NASCIMENTO et al., 2004a), as leptospiras realizam β-oxidação para a metabolização dos ácidos graxos de cadeia longa que são a única fonte de carbono (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Assim essas bactérias conseguem sobreviver em solos úmidos, lamas, pântanos, córregos e rios por longos períodos, principalmente quando o pH é ligeiramente alcalino, não resistindo a ambientes secos. Podem sobreviver em água destilada durante 110 dias, porém, quando incubadas em soluções viscosas (agarose) o tempo de vida da leptospira aumentou mais de três vezes. A sobrevivência de leptospiras foi afectada mesmo uma concentração baixa de NaCl (0,13%) (TRUEBA et al., 2004). Verificou-se que ambas as espécies saprofíticas e patogenicas de *Leptospira* formam biofilmes associados à superfície em culturas estacionárias (RISTOW et al., 2007).

1.2 Taxonomia e classificação

Pertencem às espiroquetas, um grupo primitivo de bactérias (PASTER et al., 1991), no qual são encontrados tanto gêneros de vida exclusivamente livre (ex. *Spirochaeta*), como gêneros exclusivamente dependentes de hospedeiros (ex. *Borrelia*) (PASTER; DEWHIRST, 2000). Trata-se do único gênero patogênico de espiroquetas que também é capaz de sobreviver no meio ambiente, fora do hospedeiro (VINETZ, 2001).

Leptospira, diferentemente de outros patógenos espiroquetas, produzem LPS, o que é fundamental para a taxonomia do gênero, está envolvido com a adaptação no hospedeiro e também é o alvo de anticorpos de diagnóstico. Os LPSs são complexas moléculas anfipáticas compostas por três componentes distintos ligados covalentemente, sendo eles: o lipídeo A, que é a parte hidrofóbica incorporada na membrana externa; uma parte central (MORIEL et al., 2010), que liga o antígeno O ao lípideo A; e polissacarídeo O ou antígeno O, que se estende a partir da superfície da célula para o ambiente externo (PATRA et al., 2015).

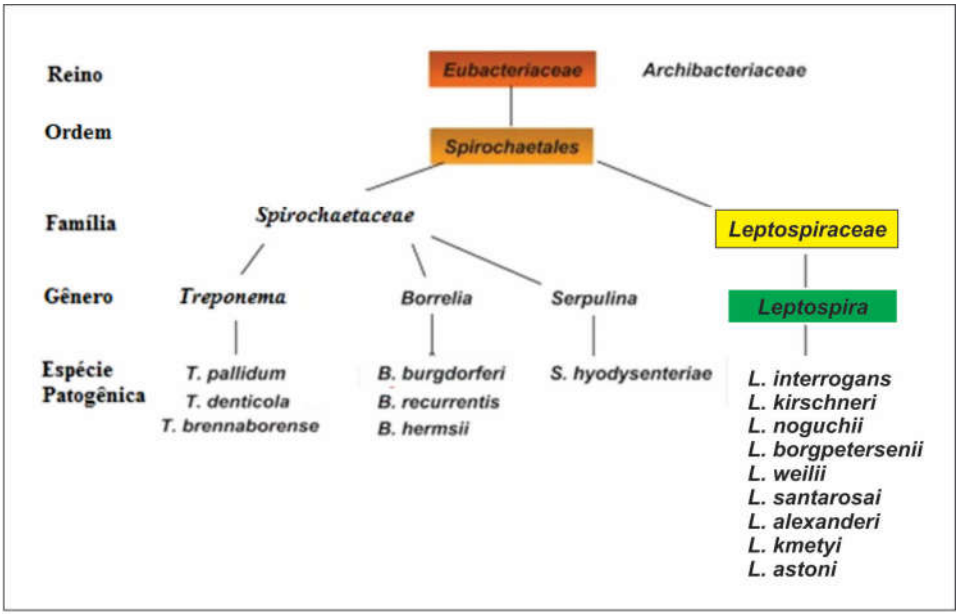


Figura 2 – Classificação taxonômica de espiroquetas de importância médica.
Fonte: Modificado de (Schroder et al., 2008).

O gênero pode ser classificado de forma genética, pela hibridização do DNA, e de forma sorológica, baseada na resposta imunológica heterogênea para os diversos LPSs presentes na membrana da bactéria.

Na classificação genética, atualmente, são conhecidas 22 espécies, sendo 9 patogênicas (*L. interrogans, L. kirschneri, L. borgpetersenii, L. santarosai, L. noguchi, L. weilii, L. alexanderi, L. kmetyi e L. alstoni*), 7 saprofíticas de vida livre (*L. biflexa, L. yanagawae, L. wolbachii, L. vanthielii, L. terpstrae, L. meyer* e *L. idonii*) e 5 intermediárias (*L. inadai, L. broomii, L. fainei, L. wolffii* e *L. licerasiae*) , cuja patogenicidade ainda é indeterminada (FOUTS et al., 2016; MOREY et al., 2006).

Na classificação sorológica, a diversidade dos sorovares é devido à heterogeneidade de carboidratos que compõem a cadeia lateral dos (JACKSON et al., 1993) da membrana bacteriana. Pelo teste de absorção de aglutinação cruzada (CAAT – *cross agglutination absorption test*) as espécies são subagrupadas em mais de 250 sorovares distribuídos em 25 sorogrupos (CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009; EVANGELISTA; COBURN, 2010).

1.3 A doença: leptospirose

A leptospirose representa um problema de saúde pública mundial, que afeta principalmente países em desenvolvimento, da região tropical, com 73% dos casos mundiais.

É estimado 1,03 milhão de casos por ano no mundo, o que coloca esta zoonose como uma das principais causas de morbidade e mortalidade (COSTA et al., 2015). A doença está incluída na lista das Doenças Tropicais Negligenciadas (http://www.who.int/zoonoses/diseases/leptospirosis/en/index.html) segundo a Organização Mundial da Saúde, que recomenda estratégias de advertência, prevenção e controle da leptospirose.

Nas grandes áreas urbanas, os roedores, em particular a espécie *Rattus norvegicus*, desempenham o papel de principais reservatórios da doença por permitirem a colonização das leptospiras nos túbulos renais proximais. Uma vez que as leptospiras obtêm acesso ao lúmen tubular renal, colonizam a borda em escova do epitélio tubular proximal renal, a partir do qual o derramamento urinário pode persistir por longos períodos de tempo sem efeitos adversos significativos no hospedeiro reservatório. Por esta razão, a infecção do hospedeiro reservatório pode ser considerada uma relação comensal (HAAKE; LEVETT, 2015).

As portas de entrada da bactéria incluem cortes e abrasões ou membranas mucosas, tais como as superfícies conjuntival, oral ou genital. A infecção humana ocorre por meio de contato direto com a urina de animais infectados ou indiretamente por meio da interação com um ambiente contaminado com urina (BHARTI et al., 2003; DUPOUEY et al., 2013; LEVETT, 2001).

As exposições recreativas incluem todos os esportes aquáticos de água doce, como exemplo, canoagem, caiaque, rafting. A importância deste tipo de exposição aumentou ao longo dos últimos 20 anos como a popularidade de esportes de aventura e corridas aumentou, e também porque o custo relativo de viagens para destinos exóticos tem diminuído (LAU et al., 2012). No entanto, a falta de saneamento adequado e moradias pobres combinam-se para exacerbar o risco de exposição à leptospiras em comunidades rurais e urbanas de favelas (BHARTI et al., 2003; FELZEMBURGH et al., 2014) e são, de longe, as exposições mais importantes, afetando milhões de pessoas que vivem em regiões tropicais.

É considerada uma doença infecciosa febril cujas manifestações clínicas podem variar desde quadros assintomáticos, leves e de evolução benigna a formas mais graves (BRASIL, 2009). A fase inicial é caracterizada por febre, calafrios, dor de cabeça e muscular, podendo evoluir para uma condição mais severa, conhecida como síndrome de Weil, caracterizada por hemorragia, falência renal e icterícia, a qual ocorre em 5-15% dos casos, com taxas de mortalidade de 5-40%. Muitas vezes, os sintomas iniciais são confundidos com os de outras doenças, como gripe e dengue. Dessa forma o tratamento adequado é postergado devido ao diagnóstico atrasado, podendo levar a óbito (FAINE et al., 1999).

Leptospirose representa um problema econômico para o Sistema de Saúde Pública, pois o tratamento requer hospitalização, em alguns casos diálise renal. Esta situação piora com a associação de leptospirose com Síndrome Pulmonar Hemorrágica (LPHS), aumentado para 50% a mortalidade destes pacientes (MACIEL et al., 2008; NICODEMO et al., 1997; PANAPHUT; DOMRONGKITCHAIPORN; THINKAMROP, 2002).

1.4 Leptospirose no Brasil

A leptospirose é um importante problema de saúde pública no Brasil, e em outros países tropicais em desenvolvimento, devido à incidência nas populações que vivem em aglomerações urbanas, sem infraestrutura sanitária adequada e sem o devido controle da população de roedores. Esses fatores, associados às estações chuvosas e às inundações, agravam a disseminação e a persistência da leptospira no ambiente, predispondo o contato do homem com águas contaminadas e facilitam a ocorrência de surtos (BRASIL, 2009). É considerada também uma doença ocupacional, pois atinge trabalhadores de serviços de água e esgotos, canaviais, arrozais, bebedouros, tratadores de animais, veterinários, entre outros (SAKATA et al., 1992).

Foi relatada ao SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Ministério da Saúde) uma média de 3750 casos por ano no período de 2000 a 2015, com um total de 360 mortes anuais. No entanto, o número de casos de leptospirose é sempre subestimado, uma vez que a leptospirose é constantemente confundida com outras doenças (devida à profusão de sintomas inespecíficos) e que somente os casos mais graves exigem hospitalização (BHARTI et al., 2003).

No Brasil, *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni são as principais causas de leptospirose urbana e têm sido amplamente estudados (MCBRIDE et al., 2005), enquanto a leptospirose rural e os sorovares associados têm sido largamente negligenciados. Da Cunha et al., (2016) relataram o primeiro caso de leptospirose humana e animal causada pelo sorogrupo Pomona sorovar Mozdok de *L. kirschneri* no hemisfério sul, tornando-se um dos sorovares prevalentes, causando doenças em humanos e animais no sul do Brasil e possivelmente em outras partes do mundo com condições ambientais semelhantes. Esse sorovar Mozdok é prevalente na Croácia, em roedores selvagens, embora o sorovar Mozdok não tenha sido implicado em nenhum caso humano, é um agente causador da leptospirose canina na Europa (STRITOF MAJETIC et al., 2014).

1.5 Diagnóstico e tratamento

Existem exames bacteriológicos e sorológicos direcionados para o diagnóstico da leptospirose, porém nenhum deles permite que a doença seja diagnosticada de maneira fácil e rápida, logo no início da infecção. A infecção por leptospira pode ser dividida em dois estágios. O primeiro estágio, fase aguda, é caracterizado por septicemia, a qual dura de 3 a 10 dias, com dores de cabeça e mialgia. O segundo estágio, estágio imune, geralmente ocorre durante a segunda semana, depois do inicio dos sintomas, e dura de 4 a 30 dias. Durante este estágio, o aumento do título de anticorpo é correlacionado com a eliminação das leptospiras do sangue (PICARDEAU, 2013).

Os pacientes apresentam início súbito de febre, calafrios e dor de cabeça. Estes sinais e sintomas são inespecíficos e também ocorrem com outras causas de síndrome febril aguda que, dependendo do cenário, também pode ser causada por gripe, dengue ou malária. A dor de cabeça é frequentemente grave e tem sido descrita como uma dor de cabeça latejante bitemporal, acompanhada de dor retro-orbital e fotofobia (HAAKE; LEVETT, 2015). Portanto, pelos sintomas serem inespecíficos o diagnóstico clínico é difícil de ser obtido.

Assim a detecção precoce e tratamento dependem de fatores epidemiológicos, sintomas e testes laboratoriais. Uma grande variedade de testes para esta doença tem sido descrita, incluindo demonstração microscópica, diagnóstico molecular, isolamento e identificação de leptospiras, bem como diagnóstico sorológico, como o teste de aglutinação microscópica (MAT) (EDWARDS; LEVETT, 2004).

O MAT foi desenvolvido há quase 100 anos, no Instituto Pasteur, e continua sendo considerado pela OMS o teste "padrão ouro" para o diagnóstico da leptosiprose (PICARDEAU, 2013). Entretanto, este diagnóstico não é capaz de detectar a doença em sua fase inicial, pois busca a presença de anticorpos contra 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). Além disso, o teste não discrimina se os anticorpos produzidos são decorrentes de uma infecção ou de vacinação. Neste teste, soros dos pacientes são colocados para reagir com suspensões de antígenos vivos de diferentes sorovares. Após incubação, as misturas de soro / antígeno são examinadas por microscopia de campo escuro para verificar a aglutinação e determinar os títulos que são considerados como a maior diluição do soro em que 50% das bactérias se encontram aglutinadas, quando comparado com o controle negativo (PICARDEAU, 2013). A necessidade de manter culturas vivas em laboratórios faz com que a relização do MAT seja restrita aos laboratórios de referência. A gama de antígenos utilizados

deve incluir sorovares representativos de todos os sorogrupos (ADLER; CHAPPEL; FAINE, 1982; TURNER, 1968) e sorovares localmente comuns.

O teste de absorção de aglutinina cruzada (CAAT), o método reconhecido de identificação de isolados leptospiráricos baseado na relação antigênica, fornece a identificação definitiva do sorovar infectante e é uma técnica importante para o estudo de surtos e epidemiologia. No entanto, este método requer a utilização de soros hiperimunes produzidos em coelhos para realizar o teste. Este método é moroso e leva 6-10 semanas antes de um título hiperimune adequado ser alcançado. O CAAT é diferente do teste de aglutinação microscópica (MAT) que é a ferramenta de diagnóstico sorológico para identificar casos da doença em seres humanos e animais (ADLER, 2015). Segundo BLANCO et al., (2016), o MAT tem sido bom para predizer o sorogrupo, entretanto, deve ser utilizado apenas para dar uma idéia dos sorogrupos comuns presentes em uma população. A técnica de escolha para isolamento e identificação do sorovar, na região de São Paulo, tem sido a CAAT.

A detecção de IgM por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é outro método diagnóstico, também reconhecido pela OMS. A especificidade é afetada pelo antígeno utilizado no ensaio, pela presença de anticorpos devido à exposição prévia (em regiões endêmicas) e pela presença de outras doenças (BAJANI et al., 2003). A detecção de IgM tem sido repetidamente mostrada como sendo mais sensível do que MAT quando a amostra é tomada no início da fase aguda da doença (CUMBERLAND; EVERARD; LEVETT, 1999; GORIS; HARTSKEERL, 2014; WINSLOW et al., 1997). Existem vários kits comerciais disponíveis no mercado e também podem ser preparados no próprio laboratório a partir de culturas de leptospira (espécie não patogênicas) (HAAKE; LEVETT, 2015).

Trata-se de um teste genérico, pois não permite detectar o sorogrupo da leptospira infectante, entretanto permite diferenciar se os anticorpos detectados pelo MAT são de uma infecção corrente ou de uma imunização ativa prévia. No entanto, existem limitações significativas para o diagnóstico precoce utilizando qualquer teste sorológico (GORIS et al., 2011; SIGNORINI et al., 2013) e o teste de uma segunda amostra é obrigatório. Além disso, foi recomendada a confirmação de resultados de testes diagnósticos rápidos por um teste de referência (GORIS et al., 2013).

Também tem sido utilizado como método diagnóstico para leptospirose, a PCR (*Reação em Cadeia da Polimerase*). Neste método, o DNA do patógeno é amplificado a partir de soro, urina, humor aquoso, líquido cefalorraquidiano e vários órgãos pós-mortem (EDWARDS; LEVETT, 2004). Os ensaios de PCR em tempo real têm sido utilizados para quantificar a carga bacteriana na leptospirose (AGAMPODI et al., 2012). Os ensaios desenvolvidos para utilização

diagnóstica podem ser divididos em duas grandes categorias, sendo: a que visam genes de manutenção, tais como rrs, gyrB ou secY; e que visam genes específicos de patógenos tais como LipL32 ou Lig (AHMED et al., 2012).

A limitação da PCR como diagnóstico está no fato da inabilidade de se detectar o sorovar. Embora isso não seja significativo para o tratamento individual de pacientes, a identidade do sorovar tem valor epidemiológico e de saúde pública (HAAKE; LEVETT, 2015).

Após o diagnóstico segue o tratamento. O início precoce da terapia antimicrobiana pode impedir alguns pacientes de progredir para uma doença mais grave. A terapia para pacientes com leptospirose, grave o suficiente para merecer hospitalização, geralmente envolve penicilina intravenosa, ampicilina, ceftriaxona ou cefotaxima G (PANAPHUT et al., 2003). Pacientes adultos com doença precoce devem receber doxiciclina 100 mg por via oral duas vezes por dia ou azitromicina 500 mg por via oral uma vez por dia. Quando a dosagem é ajustada para o peso, a azitromicina ou a amoxicilina também pode ser administrada a mulheres grávidas e crianças (HOSPENTHAL; MURRAY, 2003; RESSNER et al., 2008).

1.6 A Patogenicidade de *Leptospira* spp.

Estudar os mecanismos moleculares da patogênese desta bactéria é de grande importância para estabelecer o modo que elas conseguem ultrapassar as barreiras teciduais, se disseminar na corrente sanguínea e atingir órgãos alvos. No entanto, apesar da alta incidência de leptospirose e da gravidade da doença, a base molecular e celular da patogenicidade permanece não elucidada (ZHANG et al., 2012).

A imunidade inata do hospedeiro é ativada ao primeiro contato com a bactéria, visto que esta apresenta LPSs em sua superfície. O lipídeo A (componente do LPS) de *L. interrogans* induz o fator de necrose tumoral com cerca de um décimo da potência do lipídeo A de *E. coli*, e esse atraso pode ser explicado pela estrutura do lipídeo A da *Leptospira*, que apresenta estrutura diferenciada, com apenas um resíduo de fosfato metilado, não encontrado em nenhuma outra forma de lipídeo A de bactérias Gram negativas (QUE-GEWIRTH et al., 2004). Contudo, uma explicação da diferença de patogenicidade da *Leptospira* em humanos (hospedeiros acidentais) e camundongos / ratos (reservatório natural) pode ser dada, uma vez que nestes, os receptores de macrófagos, TLR2 (*Tool-like receptor)* e TLR4 são capazes de reconhecer LPS das leptospiras (NAHORI et al., 2005), enquanto em humanos o TLR4, o receptor clássico de reconhecimento de LPS (WERTS et al., 2001) não é ativado pelas leptospiras e é reconhecido apenas por TLR2 (CHASSIN et al., 2009). Dessa forma, uma

resposta mal estruturada por humanos talvez explique a suscetibilidade à leptospirose pelos humanos.

Quando os níveis elevados de leptospiremia ocorrem durante a infecção, o mecanismo imune inato eventualmente desencadearão respostas teciduais e sistêmicas que levam a resultados graves, como sepsis ou falha de órgãos. Os pacientes com leptospirose grave têm evidência de uma "tempestade de citocinas" com níveis mais elevados de IL-6, TNF-α do que pacientes com doença leve (MATSUNAGA et al., 2003).

A importância da imunidade celular fica evidente à medida que se compreende melhor o comportamento das leptospiras no meio intracelular. Toma et al. (2011) demonstraram que *L. interrogans* é capaz de sobreviver, replicar e escapar de macrófagos murinos, o que possibilita sua disseminação em órgãos alvos. Li et al. (2010) mostraram que as leptospiras fagocitadas por macrófagos humanos são capazes de escapar dos fagossomos para o citossol, onde elas proliferam e ativam a via de apoptose dessas células. Recentemente também foi identificada uma proteína, Mce (*mammalian cell entry*), responsável pela adesão à macrófagos e sua respectiva invasão (ZHANG et al., 2012).

Proteínas de superfície são alvos potenciais para induzir resposta imune durante a infecção e podem também mediar o processo de adesão inicial às células do hospedeiro. A adesão de leptospiras a componentes da matriz extracelular (MEC) do hospedeiro é necessária para a habilidade das leptospiras de penetrar, disseminar e persistir em tecidos de hospedeiros. Assim como outros microrganismos, as leptospiras expressam componentes de superfície que reconhecem moléculas da MEC que podem mediar a colonização (PATTI et al., 1994; SCHWARZ-LINEK; HOOK; POTTS, 2004). Várias proteínas de ligação à fibronectina e laminina foram identificadas, indicando que as leptospiras têm um repertório redundante de moléculas de adesão que são provavelmente parte das suas estratégias de invasão (VIEIRA et al., 2014). Essa redundância pode explicar o motivo dos mutantes, os quais faltam fatores de virulência, não mudarem seus fenótipos e aponta a expressão heteróloga de proteínas virulentas na cepa saprofitica, *L.biflexa* sorovar Patoc, como um modelo atraente para estudo (VIEIRA et al., 2014).

Ademais, há estudos de proteínas de leptospiras que se ligam a outros componentes das células de mamíferos, como por exemplo, a e-caderina e sugere-se que dessa forma ocorra uma cascata de sinalização para a perda de integridade intercelular. Trata-se de um receptor de superfície de células de mamíferos, principalmente células epiteliais, responsável por manter a junção célula-célula integra, por ancoragem intercelular. Já foi descrito por Evangelista et al., (2014) que somente espécies patogênicas possuem a capacidade de se ligar às caderinas.

Além disso, existem proteínas multifuncionais que exibem atividades de ligação à várias proteínas alvo como: plasminogênio / plasmina, reguladores do sistema complemento. Foi demonstrado por Vieira et al., (2009) que as leptospiras são capazes de se ligar ao plasminogênio (PLG) pelos resíduos de lisina presentes em algumas proteínas de superfície. Utilizando do ativador do hospedeiro, a leptospira mostrou-se capaz de se recobrir com plasmina (PLA), degradando assim imunoglobulinas, C3b e fibronectina, além de degradar *in vitro* fibrinogênio, evadindo do sistema imune (OLIVEIRA et al., 2013). Além disso, Vieira et al., (2013) demonstraram que o PLG sequestrado pela leptospira estimula a secreção dos ativadores tanto do tipo uroquinase como do tipo tecidual, logo nas primeiras horas de infecção. Nosso grupo vem descrevendo muitas proteínas de interação com esse sistema proteolítico, sendo elas: Lsa46, Lsa77, Lsa24, Lsa66, Lp30, Lsa30, OmpL1, Lsa20, Lsa33, Lsa23, Lsa26, Lsa36, Lsa44, Lsa45, Lsa32, Lsa37, rLIC10507 e rLIC10508 (DOMINGOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2014; MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; SILVA et al., 2016; SIQUEIRA et al., 2013, 2016; TEIXEIRA et al., 2015; VIEIRA et al., 2010b).

O sistema complemento, altamente organizado por três distintas vias de inicialização, é um importante mecanismo de imunidade inata e humoral que culmina com um poro citolítico na membrana do patógeno. Já foi descrito por Meri et al., (2005) que cepas de leptospiras resistentes ao soro são capazes de ligar fator H na sua superfície. Além disso, Barbosa et al., (2009) demonstraram a capacidade de ligar ao C4BP (C4 *binding protein*). Dessa forma, esses fatores do complemento, na superfície do patógeno, contribuem para a resistência à clivagem pelo próprio sistema complemento. Essa capacidade de ligar a fatores do sistema complemento não é perdida com a atenuação em cultura de cepas virulentas (CINCO, 2010). Já foram descritas pelo nosso grupo de pesquisa várias proteínas ligantes de C4BP, como Lsa30, Lsa25, Lsa33 e Lsa23 (DOMINGOS et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2012)

Os mecanismos responsáveis pelo sangramento na leptospirose são mal compreendidos. Hemolisinas poderiam desempenhar um papel importante na resposta tóxica e genes que codificam para muitas hemolisinas foram identificados no sequenciamento do genoma de *L. interrogans* (ZHANG et al., 2005). No entanto, quando avaliados *in vitro*, não foi possível demonstrar estas proteínas com atividade hemolítica em eritrócitos humanos (CARVALHO et al., 2009; HAUK et al., 2005).

Fibrinogênio (FG) é a principal proteína de coagulação presente no plasma sanguíneo com papel importante na coagulação do sangue e trombose (LÄHTEENMÄKI; KUKKONEN; KORHONEN, 2001). Dessa forma, um crítico fator de virulência da *Leptospira* consiste no sequestro de moléculas de Fg por proteínas específicas na superfície da bactéria, diminuindo a

formação do coágulo de fibrina e consequentemente interferindo no processo de coagulação / sangramento (OLIVEIRA et al., 2013).

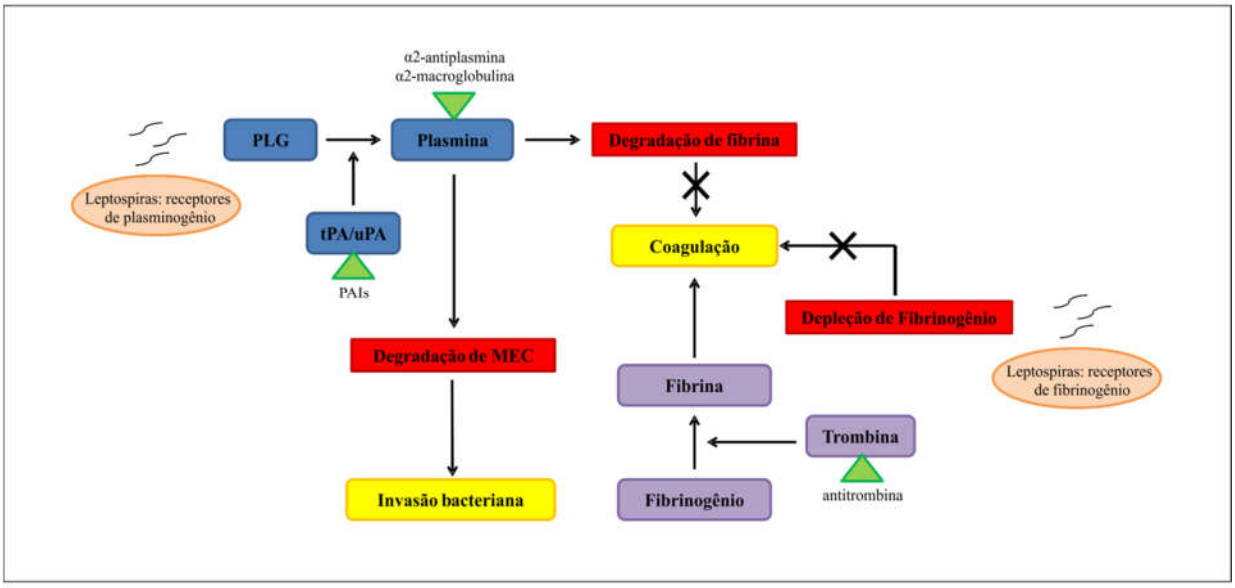


Figura 3 – Representação esquemática básica da ativação da fibrinólise e inibição da coagulação seguido da ligação de PLG e Fb por *Leptospira.* As leptospiras capturam PLGna sua superfície, que é convertido em PLA pelos próprios ativadores presentes no hospedeiro (uPA e tPA). A PLA degrada diretamente componentes da MEC (laminina e fibronectina), facilitando a invasão bacteriana. A plasmina atua também na fibrinólise, degradando fibrina, o que por sua vez inibe a coagulação. As leptospiras capturam fibrinogênio livre através de seus receptores, resultando na sua depleção. Isso inibe a cascata de geração de coágulos de fibrina, catalisada pela trombina. Os triângulos verdes indicam os inibidores de enzimas e pró-enzimas: α2-antiplasmina e α2-macroglobulina atuando sobre a plasmina, inibidores de ativadores de plasminogênio (PAIs, do inglês Plasminogen Activators Inhibitor) inibindo a ação de uPA e tPA e antitrombina modulando a ação da trombina. Fonte: Resende, 2015.

1.7 Vacina contra leptospirose

Como a *Leptospira* é uma bactéria principalmente extracelular, a proteção contra este patógeno era imaginada como sendo exclusivamente humoral (RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2004; SCHOONE et al., 1989). Sabe-se que anticorpos antilipopolissacarídeos (JACKSON et al., 1993) conferem imunidade passiva em alguns modelos animais contra um número específico de cepas e espécies de *Leptospira* (FAINE et al., 1999). Também foi demonstrado que a imunidade celular é requerida para uma proteção completa contra leptospirose bovina (NAIMAN et al., 2002). Então, uma vacina ideal contra leptospirose deve induzir níveis significativos de ambas as respostas, humoral e celular.

Atualmente existem diversas vacinas contra leptospirose para uso veterinário e em humanos, e estas são baseadas em preparações de *Leptospira* atenuada/inativada ou preparação de membranas. Embora as vacinas contra gado e suínos sejam usadas há anos, ainda existem relatos conflitantes sobre sua eficácia (FAINE et al., 1999). Por outro lado, as vacinas humanas disponíveis atualmente são raras. Entre elas, destacam-se a vacina produzida em Cuba (proteção de 97% contra os sorovares prevalentes) (MARTINEZ et al., 2004), na China (proteção de 75%) e no Japão (proteção de 60 a 100%) (KOIZUMI; WATANABE, 2005); (MCBRIDE et al., 2005). Basicamente, as vacinas atualmente em estudo contra leptospirose podem ser compostas por:

- (1) leptospiras mortas/inativadas: esta categoria, onde se incluem as vacinas cubana, japonesa e francesa, gera proteção contra os sorovares que foram utilizados na composição da vacina (proteção homóloga), porém não exibe a propriedade de causar proteção cruzada contra outros sorovares (proteção heteróloga). Outras desvantagens destas preparações são o curto tempo (cerca de um ano) e os efeitos colaterais, que incluem até mesmo o desenvolvimento de doenças autoimunes;
- (2) preparações da membrana externa de leptospira: esta categoria, que inclui a vacina produzida na China, gera maiores títulos de anticorpos que a vacina com bactéria inteira e com menores efeitos colaterais, embora possua as mesmas desvantagens de proteção de curto tempo e de falta de proteção heteróloga (KOIZUMI; WATANABE, 2005);
- (3) Preparações com lipopolissacarídeos (JACKSON et al., 1993): embora os LPS sejam antígenos majoritários da resposta sorológica contra leptospira, eles são característicos de cada sorovar, portanto este tipo de vacina tende a gerar somente proteção homóloga (KOIZUMI; WATANABE, 2005);
- (4) Proteínas recombinantes: as vantagens destas preparações incluem a composição definida e a capacidade de gerar proteção heteróloga; várias vacinas de proteína recombinante de *Leptospira* foram construídas com métodos biotecnológicos modernos, dos quais as OMPs (*outer membrane proteins*) recombinantes, as lipoproteínas e os fatores de virulência adquiriram um interesse considerável (WANG; JIN; WEGRZYN, 2007). A primeira candidata à vacina recombinante contra a leptospirose foi relatada por Haake et al., (1999), mostrando efeitos imunoprotetores da proteína de membrana externa de *Leptospira,* OmpL1 e lipoproteína LipL41. A $LigA_C$ tem sido considerada uma das candidatas antigênicas mais promissoras para uma vacina de subunidade (COUTINHO et al., 2011; KOIZUMI; WATANABE, 2004). Mais recentemente, Monaris et al, (2015) desenvolveram uma vacina multivalente contra a leptospirose, consistindo de sete proteínas de membrana externa recombinante mais flagelina

de *Salmonella* como adjuvante. No entanto, uma imunidade esterilizante continua a ser um desafio porque essas imunizações ainda não conseguiram inibir a colonização renal por leptospira.

- (5) Vacinas de DNA: são rentáveis e fáceis de produzir (BEARD; MASON, 1998); são estáveis mesmo a temperatura ambiente; induz imunidade celular e humoral (LI; SAADE; PETROVSKY, 2012); a segurança em seres humanos é bem documentada (ou seja, sem risco de infecção ou doença autoimune e baixa incidência de integração de DNA) (SCHALK et al., 2006); preços baixos (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK; BRAUN; BABIUK, 2000). Entretanto, há desvantagens como ineficiência de entrega às células e estudos limitados mostrando a eficácia em humanos (JORRITSMA et al., 2016). Alguns antígenos, como Hap1 (proteína associada à hemólise) e LipL45, foram recentemente testados em vacinas de DNA e exibiram proteção em modelo animal (BRANGER et al., 2005; FAISAL et al., 2008; VIJAYACHARI et al., 2015).

1.8 Genômica funcional de *Leptospira* spp.

O genoma completo de um organismo representa o seu potencial "proteômico", fundamental para o entendimento de sua biologia. As sequências codificadoras de proteínas estão anotadas em servidores públicos na web, sendo, dessa forma possível explorar sequências genômicas na busca de candidatos vacinais. Esta metodologia foi denominada vacinologia reversa (VR) por Rappouli, (2000). Na VR, é possível a identificação de proteínas por bioinformática, inclusive as que são expressas em pequenas quantidades, mascaradas por antígenos imunodominantes, provenientes de patógenos de difícil cultivo em laboratório. O alvo da VR é a identificação de genes que codifiquem para fatores de virulência, proteínas secretadas ou associadas à membrana, que são potencialmente capazes de mediar resposta imune no hospedeiro.

A estratégia utilizada para identificar candidatos vacinais a partir de dados obtidos com o sequenciamento de genomas, tais como o da *Neisseria meningitidis*, sorogrupo B (PIZZA et al., 2000) e do *Streptococcus pneumoniae* (WIZEMANN et al., 2001) foi muito bem sucedida. Neste sentido, o genoma da espiroqueta *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni foi sequenciado (NASCIMENTO et al., 2004a, 2004b) e mais de 250 genes que codificam para possíveis proteínas de membrana externa foram identificados, incluindo 170 novas prováveis lipoproteínas.

Atualmente já se têm disponível, ao menos, 10 genomas completos de leptospiras sequenciados, sendo eles: 3 cepas de *L. interrogans*, 2 cepas de *L. borgpetersenii*, 1 cepa de *L. santarosai*, 2 cepas de *L. licerasiae* e 2 cepas saprófitas *L. biflexa*. A genômica comparativa entre as espécies patogênicas e saprófitas identificou genes únicos que podem ter papel na virulência. O genoma das leptospiras é caracterizado por dois cromossomas circulares com tamanho variando de 3,9 a 4,6 Mb. O genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni forneceu novas perspectivas sobre a fisiologia relacionada ao metabolismo energético, tolerância ao oxigênio, sistemas de transdução de sinal e mecanismos de patogenicidade (NASCIMENTO et al., 2004a).

Nos estudos iniciais feitos no nosso laboratório, 4 lipoproteínas mostraram que são capazes de reconhecer anticorpos presentes nos soros de pacientes diagnosticados com leptospirose (GAMBERINI et al., 2005). Estes dados indicam claramente que a investigação e caracterização de lipoproteínas de *Leptospira* são de grande importância na busca de candidatos vacinais contra a doença bem como para seu diagnóstico. Atualmente, várias proteínas já foram descritas pelo nosso grupo e também são reconhecidas por soros de pacientes acometidos de leptospirose (FERNANDES et al., 2012; MENDES et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2015; VIEIRA et al., 2010b).

Devido a abordagens moleculares modernas, foi produzida uma grande quantidade de dados e várias proteínas identificadas foram descritas por interagir com componentes da matriz extracelular (MEC). Nosso grupo vem explorando estes novos genes de leptospiras e obtendo resultados muito interessantes tais como, a identificação de novas adesinas, (ATZINGEN et al., 2009; BARBOSA et al., 2006; DOMINGOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2014 ; FERNANDES et al., 2012; LONGHI et al., 2009; MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2012; VIEIRA et al., 2010a; VIEIRA et al., 2014), proteínas com possibilidade de envolvimento na resposta inflamatória de hospedeiros (GOMEZ et al., 2008; VIEIRA et al., 2007), candidatos a diagnóstico da doença na sua fase inicial (NEVES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008), proteínas envolvidas na invasão e colonização dos tecidos do hospedeiro (FERNANDES et al., 2013; VIEIRA et al., 2010b), proteínas com possível envolvimento na evasão imune (DOMINGOS et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2012) e proteínas ligantes a fibrinogênio levando a diminuição na formação do coágulo de fibrina e possível implicação na indução de focos hemorrágicos (OLIVEIRA et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Caracterizar as propriedades imunogênicas e funcionais de duas lipoproteínas preditas de *Leptospira interrogans.*

2.2 Objetivos específicos

I) Clonar os genes, expressar e purificar duas proteínas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, empregando *Escherichia coli* como sistema hospedeiro de expressão. Os genes selecionados para estudo são LIC13059 e LIC10879. Posteriormente foi adicionada a LIC13002 ao trabalho.

II) Caracterizar as proteínas recombinantes quanto a sua estrutura, pela técnica de dicroísmo circular, e reatividade com anticorpos presentes em soros de pacientes acometidos com leptospirose.

III) Avaliar a conservação das proteínas nativas nos diferentes sorovares patogênicos de *L. interrogans*.

IV) Caracterizar a interação das proteínas recombinantes com componentes do tecido e plasma do hospedeiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas de bactérias

Neste trabalho foram utilizados vários tipos de cepas de bactérias tanto de *E. coli* como de *Leptospira* spp., descritos abaixo.

3.1.1 Leptospira

As leptospiras utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo laboratório do Dr. Sílvio de Arruda Vasconcellos, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMV-USP). As bactérias foram cultivadas a 28 ºC em condições aeróbias em meio EMJH líquido modificado (Difco®, BD, Franklin Lakes, NJ ,USA) (Turner, 1970) com 10% (v/v) de soro de coelho, enriquecido com L-asparagina (m/v:0,001%), cloreto de magnésio (m/v:0,001%), peptona (m/v:0,03%) e extrato de carne (m/v:0,001%).

As cepas patogênicas atenuadas de *Leptospira* spp. utilizadas no presente estudo foram *L. interrogans* sorovar Canicola cepa Hound Utrech IV, *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae cepa RGD, *L. interrogans* sorovar Pomona cepa Pomona, *L. borgpetersenii* sorovar Castellonis cepa Castellon 3, *L. borgpetersenii* sorovar Whitticombi cepa Whitticombi, *L. kirschneri* sorovar Grippotyphosa cepa Moskva V, *L. kirschneri* sorovar Cynoptery cepa 3522C, *L. santarosai* sorovar Shermani cepa 1342 K, *L. noguchii* sorovar Panama cepa CZ 214. A cepa não patogênica utilizada foi a *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc. As cepas virulentas foram: *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 e *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm.

3.1.2 Escherichia coli

A linhagem de *E. coli* DH5α (Invitrogen, CarIsbad, CA, EUA) foi utilizada para as etapas de clonagem e duas linhagens de *E. coli* foram empregadas para ensaios de expressão: BL21 SI (Salt Induced) (Invitrogen), que possui o gene da T7 RNA polimerase integrado ao genoma sob controle do promotor proU indutível por NaCl (BHANDARI; GOWRISHANKAR, 1997), BL21 Star (DE3) pLysS (Invitrogen) que também possui o gene da T7 RNA polimerase, mas dirigida pelo promoter lacUV5, o qual é induzido por IPTG (isopropil-B-D-tiogalactopiranosídio) (STUDIER, 1991) e possui um plasmídeo pLysS que expressa uma enzima que degrada a polimerase T7, impedindo a expressão em níveis basais.

3.2 Soros de pacientes acometidos com leptospirose

Amostras de soros pareados (MAT+, referente à fase convalescente, e MAT-, fase inicial) de pacientes diagnosticados com leptospirose utilizadas neste estudo fazem parte de uma soroteca e foram cedidas pela Dra. Eliete C. Romero, do Instituto Adolfo Lutz.

3.3 Componentes biológicos

Os componentes, colágeno tipos I e IV, laminina, fibronectina plasmática e celular, elastina e a albumina de soro bovino (BSA), foram comprados da empresa *Sigma-Aldrich Corporate* (*St Louis*, MO, EUA). A laminina e o colágeno tipo IV são derivados membrana basal de sarcoma de camundongos Engelbreth-Holm-Swarm; a fibronectina celular foi derivada de fibroblastos de prepúcio humano; a elastina foi derivada de aorta humana, e o colágeno tipo I foi isolado da cauda de ratos. O plasminogênio e o fator H, purificados de plasma humano, foram comprados da EMD chemicals. O C4BP, isolado de soro de humanos normais, foi comprado da Complement Technology. A e-caderina, uma proteína recombinante obtida em *E. coli*, foi adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich.

3.4 Análise por bioinformática

Os genes foram selecionados do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, disponível no servidor público: http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/ (NASCIMENTO et al., 2004a). Esta seleção está fundamentada na localização celular das proteínas hipotéticas codificadas por estes genes, que foi feita através do programa PSORT - http://psort.nibb.ac.jp/ (NAKAI; HORTON, 1999; 2007) e CELLO- http://cello.life.nctu.edu.tw/ (YU; LIN; HWANG, 2004). A presença de sinal de clivagem ou lipidação foi avaliada com auxílio do programa LipoP - http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/ (JUNCKER et al., 2003). O peptídeo sinal também foi definido com auxilio do software SignalP - http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP.

As sequências de aminoácidos codificadas pelos genes foram analisadas pelos programas SMART - http://smart.embl-heidelberg.de/help/smart_about.html (LETUNIC et al., 2006; SCHULTZ et al., 1998) e PFAM - http://pfam.sanger.ac.uk/ (FINN et al., 2006), para verificar a presença de domínios conservados. O programa BLAST - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi (ALTSCHUL et al., 1997) foi usado para analisar as similaridades destas sequências com a de outras espécies e sorovares de *Leptospira* presentes no banco de dados.

Os cálculos de massa molecular e ponto isoelétrico (pI) das proteínas recombinantes resultantes do cassete de expressão foram feitos a partir da sequência de aminoácidos com auxilio o software ProtParam (GASTEIGER, 2006). O programa Clustal Omega, disponível em http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/help/ (LARKIN et al., 2007) foi utilizado para

alinhar sequências de diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* e assim gerar um filograma com os dados.

3.5 Extração de DNA genômico de *Leptospira* spp.

O material genético da cepa patogênica atenuada *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 foi extraído segundo a metodologia descrita por Gamberini et al., (2005). Resumidamente, foram utilizadas 3 mL de cultura previamente crescida por 7 dias, centrifugado por 30 min a 11500 x *g* à temperatura ambiente. Depois, o *pellet* foi lavado duas vezes com PBS estéril. O DNA genômico foi extraído usando o método do DNAzol® Reagent (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Amplificação das sequências de interesse

Foram utilizados oligonucleotídeos F (*forward*) e R (*reverse*) desenhados com auxílio do programa Generunner® (Hastings Software, Inc - http://www.generunner.net/) para reação de PCR (*polymerase chain reaction*). Esses oligonucleotídeos foram desenhados com o intuito de excluir a sequência correspondente ao peptídeo sinal e foram adicionados em suas extremidades sítios de enzimas de restrição *Xho*I (*forward*) e *Hind*III (*reverse*), conforme Tabela 1.

As sequências dos genes LIC13059, LIC10879 e LIC13002 foram obtidas pela reação de PCR, a qual foi realizada utilizando-se PCR buffer; 0,2 mM dNTP; 2 mM $MgCl_2$; 0,2 mM de cada oligonucleotídeo (*F* e *R*); 2,5 U Taq polimerase; 100 ng de DNA genômico da cepa M20 de leptospira, para um volume final de 50 µL. As temperaturas de anelamento utilizadas foram determinadas de acordo com o programa Generunner®.

Tabela 1 - Sequência de oligonucleotídeos empregada para amplificação dos genes.

Gene ID	Oligonucleotídeo sintético	TA	Amplicon
LIC13059	F:5´CTCGAGTGCAAAGATGATAGAATTAAAATAA 3´ R: 5´AAGCTTTTAATTTACTGGAAAAAGACTTTGA 3´	53ºC	636pb
LIC10879	F: 5´CTCGAGCATAAAAATTGTGATCCTTCCTTA 3´ R: 5´AAGCTTTTACTTTTTTAACTCAGGCGCAAG 3´	49ºC	397pb
LIC13002	F:5´CTCGAGGCAAGTAACAGTAGAAATGCGATTAAC3´ R: 5´AAGCTTCTAATCAAAAGAACGAGTTACACC 3´	53ºC	1326 pb

NOTAS: Gene ID: identificação do gene no genoma *L. interrogans* sorovar Copenhageni;
Abreviaturas (em inglês): F, "*forward*"; R, "*reverse*"; TA, temperatura de anelamento utilizada; pb, pares de base.
Os sítios das enzimas de restrição estão sublinhados.

A especificidade da amplificação e o tamanho das sequências de interesse foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (40mM Tris-acetato e 1mM EDTA). As amostras foram diluídas em tampão Ficol (azul de bromofenol, xileno cianol, glicerol e água) e coradas com Gel Red™ (Biotium, Inc, Hayward, CA, EUA). Os insertos de interesse foram recortados do gel, purificados através do kit *"GFxPCR DNA and gel band purification*" (GE Healthcare, Buckinghshire, Reino Unido) e os produtos obtidos foram quantificados em espectrofotômetro.

3.7 Subclonagem no vetor pGEM-T Easy

O vetor pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) (Figura 4) possui uma quebra de sequência com extremidades 3'T sobressalentes, o que possibilita a ligação do fragmento amplificado, uma vez que algumas polimerases acrescentam uma adenina a extremidade 3' do *amplicon*, possibilitando o anelamento e posterior ligação do arcabouço açúcar-fosfato. A presença do inserto interrompe o gene LacZ, o qual é essencial para a degradação de um substrato cromogênico, chamado X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosideo); assim, colônias positivas para o inserto são deficientes para esta degradação, ficando incolores, ao contrario das azuis, as quais degradam o substrato.

A reação de ligação foi realizada segundo a reação padrão estabelecida pelo fabricante. Os produtos de ligação foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* DH5α previamente tornadas competentes pelo método descrito por Hanahan (1983).

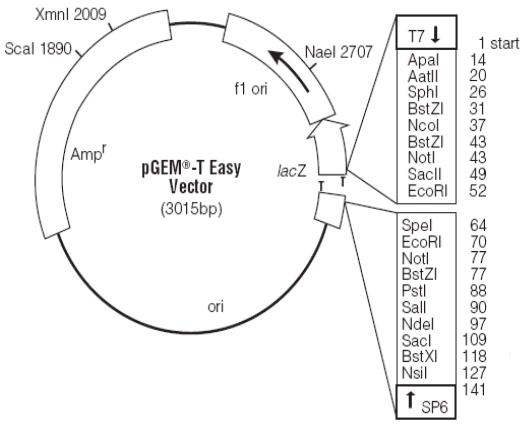


Figura 4 - Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy. **ori: origem de replicação. Ampr: gene de resistência a ampicilina. lacZ: gene para metabolismo de lactose (β-galactosidase).**

Fonte: Promega, 2016.

Para a transformação foram utilizados 5 µL do produto de ligação para 50 µL de bactéria competente, as quais foram descongeladas em gelo. Foi incubado por 30 min em banho de gelo e depois submeteu a amostra a um choque térmico, por 90s a 42 ºC. Retornou-se a amostra ao banho de gelo por mais 5 min e acrescentaram-se 350 µL de meio de cultura Luria Bertani – LB (0,5% extrato de levedura; 1% triptona; 1% NaCl). As reações foram incubadas a 37 ºC, por 1 h, sob agitação. A amostra foi plaqueada em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, 100 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) e 50 mg/mL de X-gal, sendo estes dois últimos adicionados à placa por espalhamento superficial. A amostra plaqueada foi incubada a 37 ºC, por uma noite.

As colônias positivas foram escolhidas por seleção azul / branco, inoculadas em 5 mL de LB com 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37 ºC, sob agitação, por uma noite.

Para obtenção do DNA plasmidial (pGEM-T *Easy* contendo o inserto de interesse) utilizou-se o kit "*Plasmid miniprep spin*" (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, EUA) seguindo as orientações do fabricante. Foi verificada a presença de insertos nos plasmídeos obtidos após digestão dos mesmos com as enzimas de restrição que reconhecem os sítios contidos nas extremidades 5' dos pares de oligonucleotídeos seguido de eletroforese em gel de agarose.

3.8 Clonagem no vetor de expressão pAE

Os insertos subclonados foram removidos dos plasmídeos recombinantes (pGEM-T *Easy*/inserto) por digestão com as enzimas de restrição *XhoI e HindIII* conforme recomendação do fabricante. O vetor de expressão pAE (Figura 5) (RAMOS et al., 2004) foi digerido com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para obtenção dos insertos, em tampão que garantia máximo de eficiência para as duas enzimas, utilizadas concomitantemente. Após digestão, tanto os insertos quanto o vetor de expressão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e posteriormente purificados pelo kit "*GFX PCR DNA and Gel Band Purification*" (GE Healthcare).

O vetor pAE foi desenvolvido para expressar a proteína recombinante contendo uma sequência codificadora de 6 resíduos de histidina na região N-terminal e é um sistema de alta expressão que é controlado pelo promotor do fago T7, sendo que a expressão da proteína recombinante só ocorre na presença da T7 RNA polimerase.

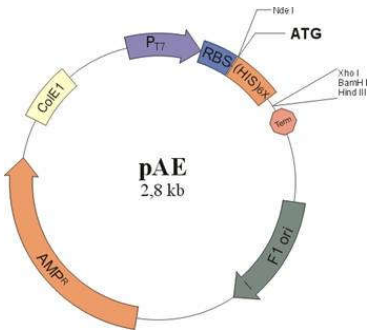


Figura 5 - Mapa do vetor de expressão pAE. PT7: promotor. (His)6x: sequência codificadora para seis resíduos de histidina. RBS: sítio de ligação ao ribossomo. ATG: códon de início da transcrição. Term: região de terminação de transcrição.
Fonte: Ramos et al., 2004.

Os diferentes fragmentos foram inseridos no vetor pAE previamente digerido. A ligação dos insertos ao vetor foi realizada em uma reação contendo inserto:vetor em uma proporção molar de 5:1. Incubaram-se 5 U de T4 DNA ligase (Amersham Pharmacia Biotech, Inc),o inserto e o vetor por 16 h a temperatura de 16 ºC.

Bactérias competentes *E. coli* DH5α foram transformadas (item 3.7) com os produtos de ligação, plaqueadas em LB/Amp e incubadas a 37 ºC por uma noite. Foram selecionadas algumas colônias aleatoriamente e então inoculadas em 5 mL de meio de cultura LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37 ºC, sob agitação, por 16 h. Para a seleção dos clones positivos, 300 µL dos inóculos foram centrifugados a 11.300 x *g*, por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 50 µL de água deionizada. Adicionou-se 20 µL de tampão de carregamento 10X (0.19% azul de bromofenol, 0.42% xileno cianol e 50% glicerol) e 28 µL de solução fenol-clorofórmio 1:1. Homogeneizou-se a amostra com o auxílio do *vórtex*. A amostra foi centrifugada a 11.300 x *g*, por 3 min e a fase superior foi analisada por eletroforese de gel de agarose. Os inóculos que apresentaram plasmídeos com alteração de tamanho comparado com o plasmídeo pAE fechado foram selecionados para a extração de plasmídeo e uma amostra seguiu para a digestão com enzimas de restrição. Dessa forma, as construções que apresentaram liberação de inserto foram selecionadas para o sequenciamento.

3.9 Sequenciamento das construções pAE/inserto

Os plasmídeos das amostras positivas foram obtidas e este DNA foi submetido a sequenciamento pelo método da terminação de cadeia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), a partir dos *primers* T7 e pAE reverso (abaixo), utilizando-se sequenciador automático ABI (PE Applied Biosystems, Foster city, CA) para a verificação dos insertos clonados.

Conforme recomendação da *Applied Biosystems*, a reação de amplificação dos fragmentos a serem sequenciados foi realizada num volume final de 20 µl contendo 500 ng de DNA molde, 3,2 pmoles de oligonucleotídeo e 2 µl do tampão *BigDye*® (Applied Biosystems) que contém: ddNTPs marcados com corantes fluorescentes específicos, dNTPs e Taq DNA polimerase. A reação foi realizada em termociclador seguindo a rotina de 40 ciclos de 94 ºC por 10 segundos; 50 ºC por 20 segundos; 60 ºC por 4 min.

Os cromatogramas obtidos foram analisados com o auxílio dos programas públicos: Chromas (http://www.mb.mahidol.ac.th/pub/chromas/chromas.htm) e Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi).

T7 "*forward*" TAATACGACTCACTATAGGG
pAE reverso: CAGCAGCCAACTCAGTTCCT

3.10 Expressão das proteínas recombinantes

A cepa de *E. coli* empregada para ensaios de expressão foram BL21 Star (DE3) pLysS. Para a LIC13002, a qual expressou baixas concentrações de proteína recombinante, foi empregada também a cepa de *E. coli* BL21 SI. As bactérias competentes *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS, foram transformadas com o plasmídeo recombinante conforme já mencionado (item 3.7) e cultivadas em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol e incubadas a 37 ºC, sob agitação, por uma noite. As culturas saturadas foram diluídas (1:25) em um novo meio, incubadas e monitoradas periodicamente por meio de leitura em espectrofotômetro até atingir uma densidade óptica entre 0,6 e 0,7, a 600 nm, que caracteriza o início da fase exponencial de crescimento. A indução foi realizada adicionando-se 0,01; 0,1 e 1 mM de IPTG incubado a temperatura de 37 ºC por um período de 3 h. Para a cepa *E. coli* BL21 SI a indução foi realizada adicionando-se 5, 50 e 500mM de NaCl e incubando as culturas a 30 ºC por um período de 3 h, em meio 2YT/ON (1% extrato de levedura; 1,6% triptona; sem adição de NaCl) contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 30 ºC, sob agitação, por uma noite.

A seguir as bactérias foram centrifugadas (3.075 x *g* /15 min / 4 ºC) e os sedimentos ressuspendidos em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 200 µg/mL lisozima; 2 mM PMSF e 1% Triton X-100). As bactérias foram então lisadas, em banho de gelo, por sonicação (sonicador Branson Ultrasonics, Danbury, USA) a 60% de intensidade por 5 min e centrifugadas novamente. Os sedimentos formados foram ressuspendidos em tampão

de desnaturação (10mM Tris-HCl pH 8,0; 150mM NaCl; 8M ureia; 5mM β-mercaptoetanol), e alíquotas do sobrenadante da sonicação e do sedimento solubilizado foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE para a análise da rLIC13059 e 15% SDS-PAGE para análise da rLIC10879.

3.11 Purificação e diálise das proteínas recombinantes

As três proteínas recombinantes foram purificadas na bancada por cromatografia de afinidade ao metal, em coluna impregnada com níquel. A purificação partiu de 300 mL de cultura induzida de *E. coli*, cujo sedimento formado após sonicação e centrifugação foi ressuspendido em 50 mL de tampão de desnaturação, por cerca de 12 h para garantir a total solubilização do *pellet*.

As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade ao metal em colunas de resina "*Chelating Sepharose*" (GE Healthcare) impregnadas com Ni^{2+}. Para remoção de contaminantes de *E. coli* foram feitas lavagens com concentrações crescentes de imidazol (5, 20, 40, 60 mM). A eluição foi feita utilizando uma alta concentração (1M) de imidazol. Proteínas recombinantes, por serem encontradas na porção insolúvel, foram desnaturadas utilizando tampão de desnaturação (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 8M ureia). A renaturação (*refolding*) se deu durante a purificação, na qual a proteína recombinante, em sua forma desnaturada, é adsorvida na coluna e são realizadas passagens na coluna de soluções com concentrações decrescentes de ureia.

A eficiência da purificação foi avaliada utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 15% para a rLIC10879 de 16 kDa e 12% para as demais proteínas recombinantes. Após a eluição, as frações contendo maior concentração de proteínas foram unidas, formando um pool de maior concentração e foram submetidas à diálise em tampão PBS (tampão fosfato-salino,0,137 M NaCl, 0,27 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 e 2 mM KH_2PO_4, pH 7,4) contendo 0,01% glicina a 4 ºC. A concentração das proteínas recombinantes foi estimada em SDS-PAGE, pela comparação destas com bandas compreendendo massas pré-estabelecidas de albumina (BSA – *Bovine Serum Albumin*), e utilização do software de análise de imagens de eletroforese Gel Quantifier Image Analysis (GelQuant, versão 2.7.0), para quantificação das bandas referentes a cada proteína recombinante de acordo com o padrão utilizado (BSA), por meio de comparação densitométrica das bandas. Foi expressa a relação de proteína recombinante por litro de cultura induzida.

3.12 Análise da estrutura das proteínas recombinantes por Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

Amostras de proteínas recombinantes foram dialisadas em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4, apropriado para análise por não conter íons cloro e, consequentemente, não interferirem nas leituras do equipamento. Os espectros foram expressos em termos de elipticidade molar residual:

$$[\Phi] = \Phi\ (mdeg)/10 \times C\ (M) \times I(cm) \times N,$$

onde Φ é a elipticidade, C é a concentração da proteína, I é o caminho ótico e N é o número de resíduos de aminoácidos nas proteínas (KELLY; JESS; PRICE, 2005). As medições de espectroscopia circular foram feitas a temperatura ambiente em um espectropolarímetro Jasco J-810 (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan). O espectro foi medido usado uma célula de 1 mm entre 190 a 260 nm, e foi apresentado uma média de 5 leituras. Os valores de elipticidade molar residual foram utilizados para predição da porcentagem de estruturas secundárias utilizando o software CAPITO, disponível em http://capito.nmr.fli-leibniz.de/index.php (WIEDEMANN; BELLSTEDT; GORLACH, 2013).

3.13 Preparação do extrato de *E. coli*

Para preparação do extrato de *E. coli* foi utilizada a cepa BL21 Star (DE3) pLysS, a mesma cepa em que a proteína recombinante foi expressa. A cepa selvagem foi inoculada em 400 mL de meio LB e deixada crescer por 16 h a 37 º C. Todo o volume de cultura saturada foi centrifugado a 3.075 x *g* por 20 min, e o *pellet* resultante foi ressuspendido em 40 mL de tampão de lise (20mM Tris-HCl pH 8,0; 200mM NaCl; 200µg/mL lisozima; 2mM PMSF e 1% Triton X-100) e lisado em banho de gelo, por sonicação (5 min a 60% no sonicador Branson).

O extrato foi utilizado em experimentos nos quais foi necessário neutralizar anticorpos contra proteínas de *E. coli.*

3.14 Imunização de camundongos para obtenção de antissoros policlonais antiproteína recombinante

Cinco camundongos BALB/c fêmeas (idade variando de 6 a 8 semanas) foram imunizados com 10 µg de cada proteína recombinante ou PBS (controle negativo, produzindo soro não reativo) em suspensão contendo *Alhydrogel* (2% $Al(OH)_3$), Brenntag Biosector,

Frederikssund, Dinamarca) como adjuvante, na concentração final de 12%, por via subcutânea. Foram realizadas três imunizações com intervalos de duas semanas. Os animais foram sangrados via plexo retro-orbital em intervalos de 15 dias, referentes a cada imunização.

O sangue coletado foi incubado a 4 ºC por 30 min e então centrifugado por 5 min a 2.000 x *g*, para separação do soro, o qual foi armazenado a –20 ºC.

3.15 Titulação de anticorpos por ELISA

A detecção de anticorpos IgG anti-rLIC13059 e anti-rLIC10879 após as imunizações foi feita por ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para a avaliação da presença de anticorpos policlonais específicos nos soros de camundongos. A concentração das proteínas recombinantes foi ajustada para 5 µg/mL em tampão carbonato 0,05 M pH 9,6 e, em seguida foram adicionados 50 µL por poço em uma placa de 96 poços (*Costar® High binding, Corning Incorporated*, EUA), resultando um total de 250 ng de proteína recombinante por poço. A placa foi incubada a 4 ºC por uma noite. Após incubação, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% (PBS-T) e então foi incubada com solução de bloqueio (PBS-T/leite desnatado 10%), 200 µL por poço, durante 2 h a 37 ºC. Foram feitas diluições seriadas de 1:100 a 1:409600 dos soros de camundongos em solução de bloqueio acrescida de extrato de *E. coli* (10% v/v). Incubaram-se estes soros por 1 h com extrato de *E. coli* para que ocorresse a adsorção dos anticorpos inespecíficos, ou seja, anticorpos gerados contra contaminantes de *E. coli* que porventura estivessem contidos nas alíquotas de proteína recombinante purificada (GRUBER; ZINGALES, 1995). Para cada antígeno foi feito uma reação "branco", ou seja, não houve incubação com os antissoros para que o sinal inespecífico do anticorpo secundário ao antígeno fosse descontado de cada reação.

Em seguida, adicionaram-se 50 µL das amostras adsorvidas por poço e foi feita incubação a 37 ºC por 1 h. A placa foi lavada e incubada por 1 h com 50 µL por poço de anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (*Sigma-Aldrich Corporate*, *St Louis*, MO, EUA) na diluição 1:5000 em solução de leite. A reação enzimática foi revelada pela adição de 100 µL de uma solução contendo 1 mg/mL de OPD (δ-phenylenediamina*, Sigma*) diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 1 µL/mL de peróxido de hidrogênio. Após 10 min de incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de solução de H_2SO_4 4N.

A intensidade da reação foi analisada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492 nm. O título individual foi determinado como sendo o valor do denominador da maior diluição do soro com valor da DO_{492} nm maior do que 0,1.

3.16 Avaliação da resposta celular

Os camundongos BALB/c imunizados com as proteínas recombinantes e PBS (controle negativo, soro não imune) foram sacrificados em CO_2 e seus baços foram assepticamente removidos e depositados em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium-RPMI-1640 meio contendo 2 mM L-glutamina, 100 IU/mL of Penicilina e 100 µg/mL de Streptomicina). Os baços foram macerados com auxílio de um *porter* e centrifugados por 10 min a 150 x *g*, a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e na 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 ressuspendidos em 1 mL de RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram contadas após marcação com 0.4% azul de tripano e então distribuídas em triplicada em uma placa de cultura celular de 96 poços (*Costar, Corning*), na quantidade de $5x10^5$ células/poço.

Os esplenócitos foram tratados com 5 µg/mL do mitógeno Concanavalina A (ConA)(Sigma-Aldrich), empregado como controle positivo de proliferação, 5 µg/mL de cada proteína recombinante ou foram destituídos de estímulo (apenas meio), sendo este tratamento empregado como controle negativo de proliferação. Como um controle a mais, esplenócitos primados com uma rLIC, foram estimulados com a outra proteína recombinante, a fim de checar se o estímulo é específico. Foi feita a cultura destas células por 48 h a 37 ºC e 5% CO_2, em atmosfera umidificada, e a taxa de proliferação celular foi determinada em função da replicação do DNA, medida pela incorporação de bromodesoxiuridina (BrdU), um análogo de base nitrogenada timina, por um kit de ELISA colorimétrico-BrdU (*Roche Diagnostic*, Indianapolis, IN).

As células foram incubadas por 2 h com BrdU para permitir a marcação do DNA genômico. Em seguida, anticorpo anti-BrdU conjugado com peroxidase (1:100) foi adicionado e as células incubadas por 90 min. Solução de substrato para a enzima foi adicionada e foi feita incubação à temperatura ambiente por 15 min; a reação enzimática foi interrompida pela adição de H_2SO_4 1M e a densidade ótica foi medida a 450 nm.

A análise estatística avaliou a diferença entre as médias do tratamento no qual as células foram estimuladas com a proteína, entre o grupo imunizado e grupo PBS (controle negativo). Sendo detectada diferença significativa, a análise estatística foi então feita dentro do grupo dos animais imunizados entre o tratamento com proteína e meio de cultura.

3.17 Detecção de anticorpos IgG e IgM em soros de pacientes diagnosticados com leptospirose em fase inicial e fase convalescente da doença

A detecção de anticorpos IgG e IgM anti-rLIC13059 e anti-rLIC10879 foram realizados imobilizando os antígenos de interesse em placa de ELISA, neste caso as proteínas recombinantes, compondo uma massa de 250 ng de proteína por poço. Os soros humanos foram empregados na diluição de 1:100 e os mesmo foram adsorvidos por 1 h em extrato de *E. coli* 10%. O anticorpo secundário, anti-IgG humano conjugado com peroxidase ou anti-IgM conjugado com peroxidase, foi empregado na diluição de 1:10.000 e incubado por 1 h. Seguiu-se a lavagem e a reatividade foi determinada por adição de 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 10 min de incubação no escuro, a reação enzimática foi finalizada por adição de 50 µl de solução 4N de H_2SO_4. A intensidade da reação foi analisada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492 nm.

Para a determinação da frequência de pacientes positivos para a presença de anticorpos, foi utilizado como limiar o valor de corte (*cutoff value*), o qual foi baseado na densidade ótica de 3 *pools* comerciais (Sigma-Aldrich) sendo calculado como a média dos valores de absorbância apresentados pelos indivíduos somada a 3 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.

3.18 Preparo dos extratos proteicos de *Leptospira* spp.

Culturas de leptospiras previamente mencionadas foram crescidas por 1 semana e então 20 mL foram centrifugados a 4 ºC por 20 min, a 3.075 x *g*. O sobrenadante resultante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com 5 mL de PBS Low-salt (PBS*ls*).

O sedimento resultante ao final das lavagens foi ressuspendido em 100 µL de PBS, sendo esta alíquota empregada como extrato proteico total de *Leptospira*.

3.19 Separação das proteínas por Western-blotting

As proteínas ou extratos a serem avaliados foram separados por SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose "Hybond-ECL" (GE Healthcare) em sistema semi-

úmido (GE) por 1 h a 0,8 mA por cm^2 em Tris-Glicina acrescido de 1,85% de SDS (tampão de transferência). A eficiência da transferência foi avaliada por coloração de *Ponceau S* (Sigma). A membrana foi então lavada e incubada com solução de bloqueio (PBS-T/leite desnatado 10%) durante uma noite a temperatura de 4 ºC.

A membrana foi lavada e logo após foi incubada com anticorpo primário e secundário, dependendo do experimento. Lavou-se novamente a membrana por 15 min com PBS-T, e as frações detectadas utilizando kit ECL *Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare). A quimiluminescência da reação da peroxidase conjugada aos anticorpos secundários foi detectada com auxílio do software *Carestream Molecular Imaging* (Carestream Health, Inc.) acoplado ao aparelho Gel Logic 2200PRO.

3.20 Ensaios de localização das proteínas nativas na bactéria

3.20.1 Acessibilidade à proteínase K (PK)

A digestão enzimática das proteínas localizadas na superfície de *L.interrogans* cepa M20 foi feita segundo protocolo descrito por Pinne e Haake (2009), com algumas modificações. Foi utilizada cultura de leptospiras crescida por uma semana, centrifugadas (3.075 x *g* por 20 min) e ressuspendidas em tampão de proteólise, contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 5 mM $CaCl_2$, compondo um total de 10^8 leptospiras/mL por tratamento.

Foram feitos diferentes tratamentos, mudando os tempos de contato com a proteinase K (PK, Sigma), na concentração de 40 µg/mL. Assim sendo, as bactérias foram incubadas a 37 ºC, sob baixa agitação, durante 0 h (representando o tratamento sem degradação de proteínas de superfície), 1 h e 3 h. Quando os períodos de incubação foram atingidos, a atividade da PK foi cessada por meio da adição de 2 mM de PMSF, um inibidor de serino-protease, e as bactérias centrifugadas e ressuspendidas em 100 µL PBS*ls*.

Amostras dos diferentes tratamentos foram colocadas em câmara de *Petroff-Hausser* para contagem em microscópio de campo escuro, com o propósito de normalizar a quantidade de bactéria por amostra. Estas foram aquecidas a 96 ºC por 5 min e separadas em gel de SDS-PAGE. Seguiu-se a transferência para membrana de nitrocelulose, o bloqueio com PBS-T/10% leite desnatado e, posteriormente, a detecção com antissoros. Os antissoros específicos utilizados (na diluição de 1:500) foram os produzidos contra as proteínas recombinantes e contra DnaK, utilizada como controle por se tratar de uma proteína citoplasmática, a qual não é degradada por PK.

3.20.2 ELISA de bactéria intacta

O antissoro policlonal produzido (item 3.14) foi utilizado para detectar a proteína nativa de interesse em uma amostra de bactéria intacta, fixa em placa de ELISA.

Foram utilizados 10 mL de cultura de leptospiras (*L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M-20) crescidas por uma semana, centrifugadas (3.075 x *g* por 20 min), lavadas e ressuspendidas em PBS*ls.* Foi feito *coating* da placa com 10^7 bactérias por poço em temperatura ambiente por 16 h. A placa foi bloqueada com PBS*ls* + BSA (3%) por 2 h a 37 ºC. Antes de colocar o antissoro em contato com a bactéria, esses foram adsorvidos com extrato de *E. coli,* por 1 h a 37 ºC. Foi colocado o antissoro contra recombinante na proporção de 1:500 e anti-DnaK (proteína citoplasmática) 1:1000, por 1 h a 37 ºC. A placa foi lavada com PBS*ls* e foi adicionado 100 µL por poço do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidade, na diluição de 1:5000, e a incubação procedeu por 1 h a 37 ºC.

A reação enzimática foi revelada pela adição de 100 µL de uma solução contendo 1 mg/mL de OPD (δ-phenylenediamina, Sigma) diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 1 µL/mL de peróxido de hidrogênio. Após 10 min de incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de solução de H_2SO_4 4N. A intensidade da reação foi analisada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492 nm.

3.21 Ensaios de interação aos componentes do hospedeiro

3.21.1 Ensaio de interação das proteínas recombinantes aos componentes da matriz extracelular e plasma

As macromoléculas empregadas nos estudos de interação foram laminina, e-caderina, colágeno tipos I e IV, fibronectina celular e plasmática, vitronectina, elastina, plasminogênio, fibrinogênio, fator H, C4BP, componentes do complemento e os controles negativos fetuína, gelatina e BSA.

Cada um desses componentes foi diluído em PBS e adicionado em placa de ELISA (1 µg/poço, exceto a e-caderina 0,5 µg/poço), os quais foram incubados por 16 h a 4 ºC para imobilização. Após esse período, as placas foram lavadas e então bloqueadas com PBS-T acrescido de 1% BSA; as placas foram incubadas a 37 ºC por 2 h.

A solução de bloqueio foi descartada, as placas lavadas e a cada poço foi adicionado 1 µg de cada proteína recombinante em 100 µL de PBS-T/BSA (1%), a fim de garantir o máximo de especificidade às reações. A interação entre componente e proteína foi estendida por 2 h a

37 ºC, e então as placas foram lavadas três vezes e a detecção das proteínas recombinantes ligadas foi feita através da adição de *pool* de soro policlonal produzido contra cada proteína recombinante na diluição 1:2000 em 100 µL de PBS-T/BSA (1%). As placas foram incubadas por 1 h a 37 ºC, então novamente lavadas, e foram adicionados 100 µL por poço do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidade, na diluição de 1:5000, e a incubação procedeu-se por 1 h a 37 ºC. A reação foi revelada com substrato OPD conforme mencionado anteriormente (item 3.20.2).

Para confirmação da ligação, o mesmo experimento foi feito e a reatividade foi avaliada pela utilização do anticorpo monoclonal anti-His conjugado com peroxidase, utilizado na diluição de 1:10.000 em PBS-T/BSA (1%). A reação enzimática colorimétrica está descrita no item 3.20.2.

3.21.2 Curva de dose-resposta da ligação das recombinantes aos componentes

Para aqueles componentes aos quais foi verificada ligação significativa das recombinantes, foi realizada uma curva de dose-resposta, a fim de caracterizar a ligação e determinar a afinidade ao componente. Para isso, as placas de ELISA foram imobilizadas com cada componente (como controle negativo foi utilizado BSA) e bloqueadas; então foram adicionadas concentrações crescentes de cada recombinante, diluídas em PBS-T/BSA (1%). A detecção da ligação foi realizada utilizando o anticorpo monoclonal anti-his na diluição de 1:10.000 em PBS-T/BSA (1%). O anticorpo anti-his é conjugado com peroxidase, portanto a detecção foi feita pela reação enzimática de revelação, pela adição de 100 µL de uma solução contendo 1 mg/mL de OPD (δ-phenylenediamina, Sigma) diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 1 µL/mL de peróxido de hidrogênio. Após 10 min de incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de solução de H_2SO_4 4N. A intensidade da reação foi analisada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492 nm.

Os valores de absorbância obtidos nas diferentes concentrações foram utilizados para calcular a constante de dissociação (K_D) de acordo com o método anteriormente descrito por Lin et al.,(2009) com base na equação K_D= (A_{max} x [proteína])/ A) - [proteína] , na qual A é a absorbância em uma determinada concentração, A_{max} é a absorbância obtida na saturação da ligação, [proteína] é a concentração de proteína.

3.21.3 Caracterização da ligação das recombinantes à laminina

Foi avaliada a importância dos resíduos de açúcar da laminina na ligação com a proteína recombinante. Para isso, a laminina foi diluída em tampão contendo 50 nM de acetato de sódio pH 5,0 na concentração de 10 µg/mL e imobilizada em placa de ELISA. Seguiu o tratamento da laminina com diferentes concentrações de metaperiodato de sódio (Sigma-Aldrich) de 0-100 mM por 15 min, a 4 ºC, no escuro, para a oxidação dos açucares da macromolécula. Após o tratamento, as proteínas recombinantes foram adicionadas aos poços, na concentração de 1 µg/poço e incubadas por 2 h a 37 ºC. Após três lavagens com PBS-T, a detecção se deu por adição anticorpo monoclonal anti-his na diluição de 1:10.000. Após incubação a placa foi lavada e seguiu a reação enzimática colorimétrica como descrito no item 3.21.2.

A análise estatística foi realizada com a média dos valores de absorbância obtida pela ligação das proteínas recombinantes à laminina oxidada foi comparada com a média dos valores de absorbância obtidos pela ligação das proteínas recombinantes à laminina sem oxidação pelo teste t-*Student*, sendo os valores $P<0,05$ foram considerados significantemente positivos.

3.21.4 Caracterização da ligação das recombinantes ao plasminogênio

Foi avaliada a importância dos resíduos de lisina na interação entre as proteínas recombinantes e o plasminogênio. Para tal, as proteínas recombinantes foram diluídas para 10 µg/mL em tampão contendo diferentes concentrações (2 e 20 mM) do análogo de lisina, o ácido 6-aminocapróico (ACA) (Sigma). As soluções então foram adicionadas aos poços imobilizados com plasminogênio (1 µg / poço) e a detecção da ligação foi feita conforme acima mencionado. Como controle de máxima ligação, foi utilizado um tratamento sem o análogo de lisina (ACA).

Após a interação, a detecção da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio foi realizada utilizando o anticorpo anti-his na diluição de 1:10.000 em PBS-T/BSA(1%). A detecção de ocorreu conforme mencionado no item 3.21.2.

A análise estatística foi realizada com a média dos valores de absorbância obtida pela ligação das proteínas recombinantes incubadas com ACA foi comparada com a média dos valores de absorbância obtidos pela ligação das proteínas recombinantes sem o competidor pelo teste t-*Student*, sendo os valores $P<0,05$ foram considerados significantemente positivos.

3.21.5 Ensaio de atividade enzimática da plasmina

Este experimento foi realizado para verificar se o plaminogênio ligado às proteínas recombinantes consegue ser convertido a plasmina, na presença de ativadores específicos.

Para tanto, o procedimento foi realizado conforme proposto por Vieira *et al*. (2009). Em suma, as placas de ELISA foram incubadas com 1 µg de cada proteína recombinante ou BSA (empregado como controle negativo) por poço, em triplicata, lavadas 3 vezes com PBS-T e bloqueadas com PBS-T/BSA (1%), por 2 h a 37 ºC.

Em seguida, foi adicionado 1 µg de plasminogênio por poço, e este foi deixado interagir com as proteínas imobilizadas por 2 h a 37 ºC. As placas foram lavadas e a cada poço foram adicionados 4 ng de ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA-Sigma) e substrato cromogênico para plasmina, *D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride* (Sigma), na concentração de 0,4 mM e volume final de 100 µL, em PBS. Foram incluídos controles, sendo um dos componentes omitido (plasminogênio ou uPA ou substrato).

As placas foram incubadas por 16 h a 37 ºC e a degradação do substrato foi aferida por meio de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm.

3.21.6 Recrutamento de plasminogênio a partir do soro humano

O *coating* foi realizado em placa de ELISA, com 1 µg de cada proteína recombinante ou com gelatina (controle negativo). Os poços foram lavados três vezes com PBS-T e bloqueados por 40 min a temperatura ambiente com solução de bloqueio SuperBlock T20 (TBS) (Thermo Scientific). Descartado o bloqueio, houve a incubação com soro humano comercial (Sigma-Aldrich) (0-20%) diluído em 100 µL de SuperBlock por 90 min a temperatura ambiente. Depois da lavagem com PBS-T, a ligação da proteína recombinante ao PLG foi detectada por anticorpo anti-PLG diluído (1:5000) em solução SuperBlock por 1h à 37 ºC. Depois da lavagem com PBS-T, foi incubado com anti-*mouse* IgG HRP-conjugado (1:5000) (Sigma-Aldrich) diluído também em SuperBlock, por 1h à 37 ºC. Os poços foram lavados mais três vezes e a detecção se deu por adição de 100 µL de OPD (1 mg ml^{-1}) em tampão citrato fosfato mais 1 µL H_2O_2 ml^{-1}. A reação foi interrompida após 10 min de incubação, por adição de 50 µL de H_2SO_4 (4N). A absorbância foi medida em 492 nm em leitora de placa (Multiskan FC; Thermo Scientific).

3.21.7 Inibição do coágulo de fibrina

Diferentes concentrações das proteínas recombinantes (5/ 2,5/ 1,25/ 0,625 µM) foram incubadas com fibrinogênio (1 mg/mL) por 2 h a 37 ºC. Foram colocados 90 µL da solução de fibrinogênio mais proteína recombinante em cada poço de uma placa de ELISA, bem como 10 µL de uma solução 10 U/mL de trombina (Sigma), para iniciar a formação do coágulo de fibrina.

A reação foi prolongada por 45 min e foi empregado um controle negativo, no qual a trombina foi omitida da reação, e um controle positivo, no qual não houve incubação do fibrinogênio com a recombinante, ou seja, uma situação onde o coágulo se forma livre de interferência.

A formação do coágulo de fibrina foi medida por meio da leitura da turbidez no comprimento de onda de 595 nm em leitora de placa.

3.21.8 Avaliação dos epítopos imunogênicos e da conformação estrutural das proteínas recombinantes na ligação com os diferentes componentes

Para o *coating* em placa de ELISA foi utilizado 1 ìg de laminina (LAM), plasminogênio (PLG) e fibrinogênio (FG) em 100 ìl de PBS e incubado 16 horas a 4 ºC. A placa foi lavada 3 vezes com PBS-T, bloqueada com PBS-T contendo 1% BSA a 37 °C por 2 horas e, posteriormente, lavada 3 vezes com PBS-T. Separadamente, a proteína recombinante foi incubada com seu respectivo antissoro, na diluição de 1:100, por 2 horas a 37 °C e, em paralelo, as proteínas recombinantes foram desnaturadas por 10 min a 96 ºC. Neste experimento, foram utilizados três controles, sendo: a proteína sem incubação prévia com anticorpo; a proteína incubada com o antissoro de animais inoculados com PBS, antissoro não imune; com a presença apenas do componente e o anticorpo secundário (anti-His). Após o bloqueio a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e então foi adicionado 1 ìg de proteína recombinante previamente incubada com antissoro ou desnaturada a fim de medir a diminuição de ligação entre a proteína recombinante e o componente. A placa foi incubada por 2 horas a 37 °C, após a 3 lavagens com PBS-T, a ligação foi detectada utilizando o anticorpo monoclonal anti-His conjugado com peroxidase na diluição de 1:10.000 e revelada por OPD conforme descrito anteriormente.

3.22 Teste de aglutinação microscópica (MAT)

O teste de aglutinação foi feito de acordo com Faine et al., (1999). Em suma, 22 sorovares de *Leptospira* spp. foram empregados como antígenos: Australis, Autumnalis, Bataviae, Canicola, Castellonis, Celledoni, Copenhageni, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Sejroe, Shermani, Tarassovi e Wolffi. Todas as cepas foram mantidas em meio EMJH. Um MAT+ é definido pela demonstração aumento em 4X nos títulos de aglutinação em soros pareados. Um MAT- é considerado quando o título de aglutinação fica abaixo de 100.

Este é um experimento rotineiro na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, SP, Brasil.

3.23 Análises estatísticas

Todos os resultados são expressos como a média ± desvio padrão. Teste t-*Student* pareado foi usado para determinar a significância da diferença entre as médias, e um p-valor abaixo de 0,05 indica uma diferença estatisticamente significante.

3.24 Comitê de Ética animal e humano

Todos os estudos com animais foram aprovados pelo comitê de ética do Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil, sob o protocolo 1372/15. O Comitê de Pesquisa Animal no Instituto Butantan adota o guia do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. O presente trabalho também foi analisado pela CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais e pela CEPSH – Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, sob protocolo CEP-ICB nº 721/15.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de bioinformática dos genes selecionados

Tal como outras espiroquetas, as leptospiras têm um grande repertório de lipoproteínas e proteínas de membrana que devem estar envolvidas na mediação das interações da célula hospedeira. Dessa forma, o estudo de proteínas de membrana de *Leptospira* é importante.

Segundo o *software* LipoP (JUNCKER et al., 2003), todas os genes selecionados codificam proteínas que possuem sítio de clivagem e que possivelmente serão destinadas à membrana da *Leptospira*. A maioria das lipoproteínas de *Leptospira* está presente em sua membrana externa (HAAKE et al., 2000). As proteínas relativas aos genes LIC13059 e LIC10879 possuem sinal SpII, portanto trata-se de possíveis lipoproteínas, pois essa região é reconhecida pela enzima peptidase sinal II, a qual é responsável pela clivagem do peptídeo sinal e pela lipidação de resíduos de cisteína. Já a proteína relativa ao gene LIC13002 apresenta hélice transmembrana (TMH), segundo o mesmo programa, portanto também será localizada na membrana da bactéria.

Adicionalmente, os softwares PSORT e CELLO foram utilizados para definir a localização celular das proteínas, por meio de algoritmo funcional para bactérias gram-negativas. De acordo com os resultados, a proteína codificada pelo gene LIC13002 está alocada na membrana externa com alta probabilidade. A proteína codificada pela LIC13059 foi dada como proteína de membrana interna pelo PSORT e como periplasmática pelo CELLO, já a proteína codificada pela LIC10879 é predita como de membrana externa pelo PSORT e periplasmática pelo CELLO. Devido a sequência lipobox das espiroquetas exibirem mais

plasticidade do que de qualquer outra bactéria, a aplicação de algoritmos de predição existentes para dados de sequência de *Leptospira* tem sido problemático (SETUBAL et al., 2006). A tabela 2 mostra resumidamente a análise por bioinformática dos genes selecionados para o estudo.

Tabela 2 - Resumo da análise por bioinformática.

Gene ID	PSORT	CELLO	LipoP
LIC13059	Membrana interna	Periplasmática	SpII
LIC10879	Membrana externa	Periplasmática	SpII
LIC13002	Membrana externa	Membrana externa	TMH

NOTAS: Gene ID: identificação do gene no genoma *L. interrogans* sorovar Copenhageni;

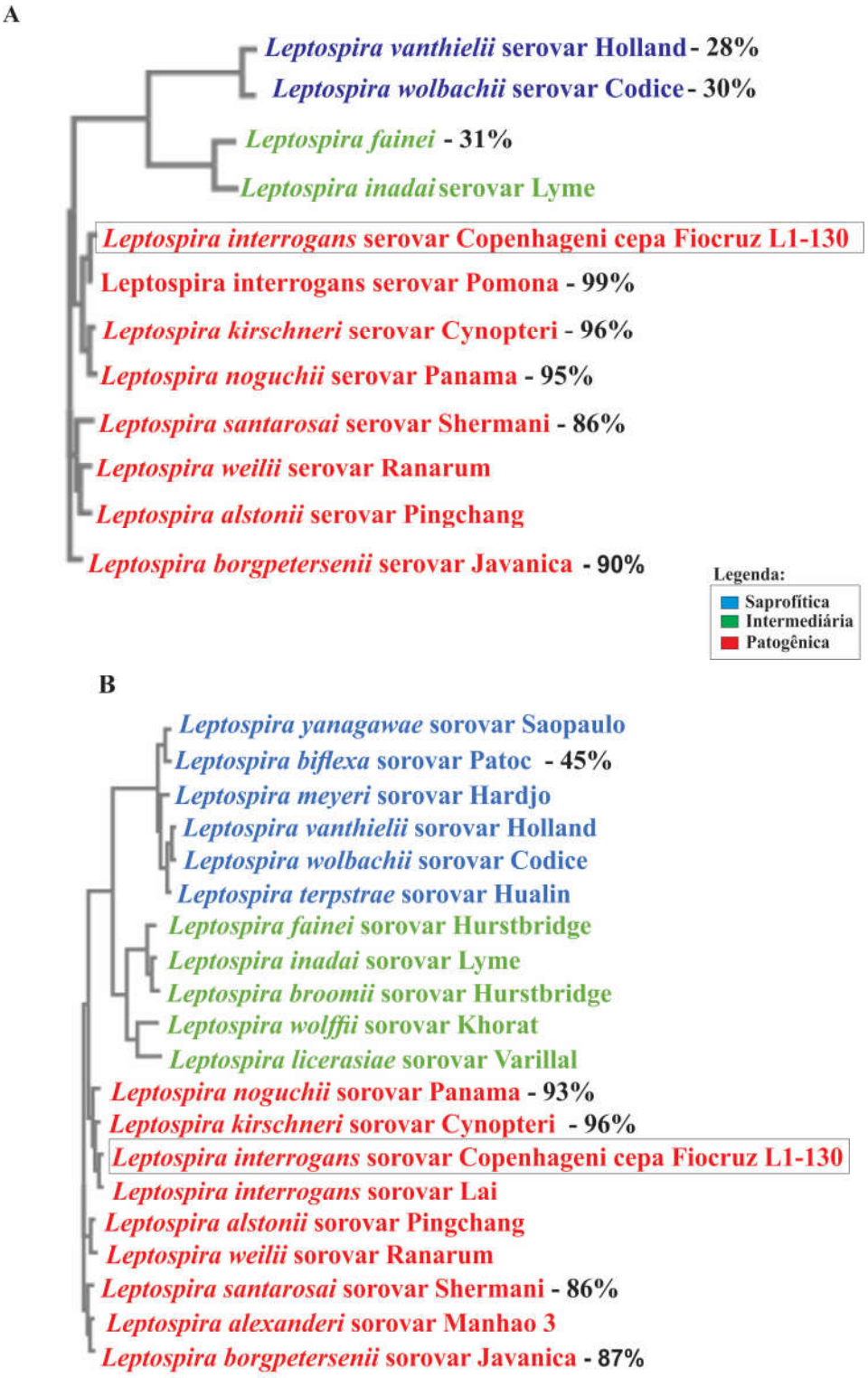
As proteínas codificadas pelos genes LIC13059 e LIC10879 foram quantificadas no trabalho de proteômica quantitativa (MALMSTROM et al., 2009) na espécie de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (virulenta) e apresenta cerca de 723 e 1600 cópias por bactéria, respectivamente. Diferentemente para a LIC13002, foi detectada, porém não foi possível quantificá-la, pois o número de cópias ficou abaixo do limite de detecção. Esses dados corroboram com o estudo dos genes em questão, uma vez que permite o conhecimento da concentração das proteínas expressas em função do estado celular.

Outra análise realizada foi pelos programas PFAM (SONNHAMMER; EDDY; DURBIN, 1997) e SMART (LETUNIC et al., 2006; SCHULTZ et al., 1998), os quais avaliam a presença de domínios proteicos, responsáveis por desempenhar uma função específica. Somente a proteína codificada pelo gene LIC13002 apresentou um domínio chamado de Tolueno X, que está relacionada ao catabolismo do tolueno e degradação de hidrocarbonetos aromáticos. O fato de apresentar este domínio reforça que esta proteína deva estar localizada na superfície bacteriana.

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

Há grande variedade de composição antigênica entre os diversos sorovares de *Leptospira* (LEVETT, 2001), portanto proteínas que sejam conservadas entre suas diversas espécies e sorovares são importantes quando se trata do estudo de uma proteína com potencial vacinal.

Para avaliar a presença dos genes estudados em outras espécies e sorovares foi utilizada a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), e para visualização do grau de similaridade foi realizado um alinhamento múltiplo com as sequências ortólogas. Dessa forma, foi gerado um filograma a partir das sequências de aminoácidos, ilustrado na figura 6.


A
Leptospira vanthielii serovar Holland - 28%
Leptospira wolbachii serovar Codice - 30%
Leptospira fainei - 31%
Leptospira inadai serovar Lyme
Leptospira interrogans serovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130
Leptospira interrogans serovar Pomona - 99%
Leptospira kirschneri serovar Cynopteri - 96%
Leptospira noguchii serovar Panama - 95%
Leptospira santarosai serovar Shermani - 86%
Leptospira weilii serovar Ranarum
Leptospira alstonii serovar Pingchang
Leptospira borgpetersenii serovar Javanica - 90%
Legenda:
Saprofítica
Intermediária
Patogênica
B
Leptospira yanagawae sorovar Saopaulo
Leptospira biflexa sorovar Patoc - 45%
Leptospira meyeri sorovar Hardjo
Leptospira vanthielii sorovar Holland
Leptospira wolbachii sorovar Codice
Leptospira terpstrae sorovar Hualin
Leptospira fainei sorovar Hurstbridge
Leptospira inadai sorovar Lyme
Leptospira broomii sorovar Hurstbridge
Leptospira wolffii sorovar Khorat
Leptospira licerasiae sorovar Varillal
Leptospira noguchii sorovar Panama - 93%
Leptospira kirschneri sorovar Cynopteri - 96%
Leptospira interrogans sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130
Leptospira interrogans sorovar Lai
Leptospira alstonii sorovar Pingchang
Leptospira weilii sorovar Ranarum
Leptospira santarosai sorovar Shermani - 86%
Leptospira alexanderi sorovar Manhao 3
Leptospira borgpetersenii sorovar Javanica - 87%

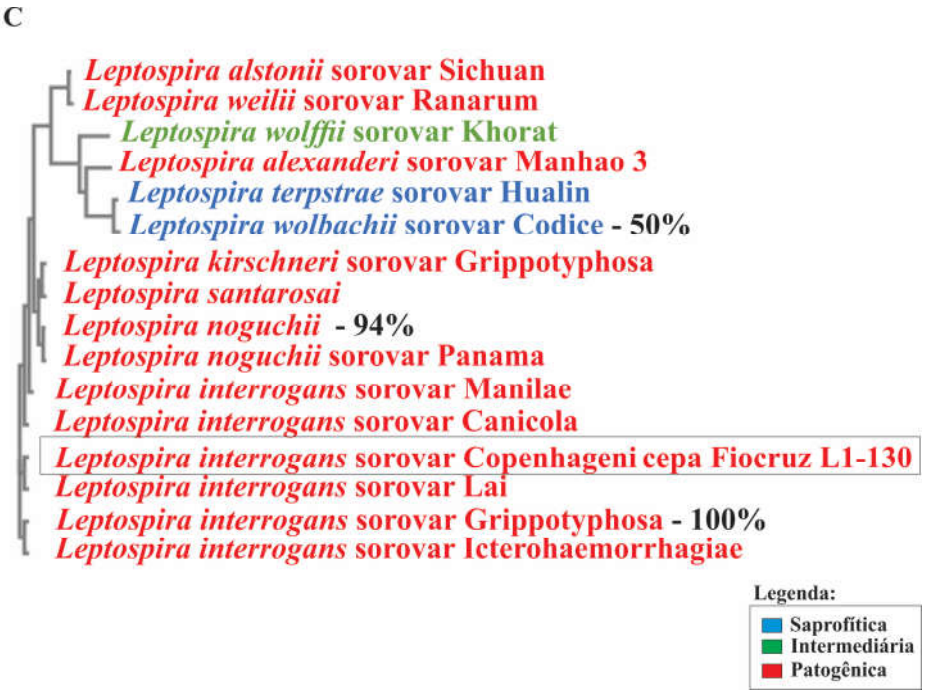


Figura 6 - Filogramas obtidos pelo software Clustal Omega por alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos. O filograma foi construído tendo como referencial a proteína codificada pela espécie *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 que está destacado por um retângulo. As porcentagens indicam a identidade da cepa em relação à cepa de referência. (A) Filograma da LIC13059. (B) Filograma da LIC10879. (C) Filograma da LIC13002. Em azul estão representadas as espécies saprofíticas, em verde estão representadas as espécies intermediárias e em vermelho, as patogênicas.

Os filogramas foram construídos tendo como referencial a proteína codificada pela espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, que é uma espécie patogênica e virulenta. A partir do programa BLAST Protein, foram selecionadas sequências em modo fasta, as quais foram alinhadas por grau de similaridade, pelo programa Clustal Omega, disponível em http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/. No filograma pode-se observar a similaridade da proteína codificada pelo gene LIC13059 com as proteínas de cepas patogênicas principalmente. Essa similaridade vai diminuindo ao comparar com proteínas de cepas intermediárias (em verde) e saprofíticas (em azul). O mesmo acontece no filograma da LIC10879, entretanto, pode-se observar um ortólogo na espécie *L. biflexa* sorovar Patoc (45% de identidade), espécie saprofítica. Já no filograma da LIC13002, pode-se observar na mesma chave similaridade proteínas de espécies patogênicas, intermediárias e saprofíticas. No entanto, apesar de estar na mesma chave do filograma, pode-se observar uma similaridade de apenas 50% com a espécie saprofítica, sugerindo que esta seja uma proteína diferente da original, a qual está sendo comparada.

Pode-se inferir dos filogramas que as proteínas em estudo são bastante conservadas principalmente em espécies patogênicas, o que sugere uma possível participação na virulência do patógeno. Além disso, proteínas com alto grau de conservação *in silico* entre espécies patogênicas são interessantes para estudo uma vez que é fundamental para o desenvolvimento de uma vacina.

4.3 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes

As sequências de DNA correspondentes aos genes LIC13059, LIC10879 e LIC13002 foram amplificadas pela técnica de PCR (Figura 7A e B), a partir do DNA genômico extraído da cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 1.

O amplicon de DNA obtido pela reação de PCR foi utilizado para subclonagem em vetor pGEM-T Easy (Promega). Após transformação em bactérias competentes, clones positivos selecionados por coloração azul/branco seguiram para extração de DNA plasmidial, subsequentemente foram digeridos com as enzimas de restrição que reconhecem os sítios inseridos nas extremidades 5´ dos oligonucleotídeos, para certificação da presença de insertos.

Os insertos foram removidos dos plasmídeos recombinantes (pGEM-T Easy/inserto) por ensaio de restrição utilizando as enzimas de restrição apropriadas, e os insertos foram purificados do gel de agarose. Os tamanhos esperados para o inserto da LIC13059 é de 636 pb, da LIC10879 é de 397 pb e da LIC13002 é de 1326 pb, como representado na figura 7C.

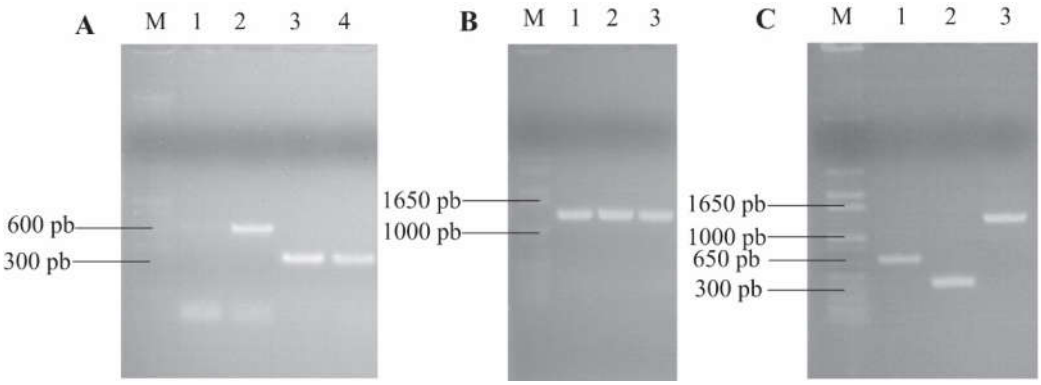


Figura 7 - Análise dos genes de interesse em gel de agarose 1%, após amplificação. M- Marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) **A)** Amplificação da LIC13059 à temperatura de 45 ºC (1) não houve amplificação; à temperatura de 50 ºC (2) fragmento em 636pb; Amplificação da LIC10879 à temperatura de 50 ºC (3) e à temperatura de 55 ºC (4), fragmento em 397pb. **B)** Amplificação da LIC13002 nas temperaturas de (1) 45ºC; (2) 50 ºC; (3) 55 ºC com fragmentos em 1326pb. **C)** Gel de agarose para análise da purificação dos insertos referente à LIC13059 (1); LIC10879 (2); LIC13002 (3).

Com os insertos purificados, foi feita a ligação no vetor de expressão pAE. Como este vetor não possui um diferencial de seleção para as colônias positivas com o inserto, deve-se fazer uma avaliação de diversas colônias, por meio de uma extração de plasmídeo.

Após extração rápida por fenol-clorofórmio foram selecionados alguns clones presumivelmente positivos, ou seja, que apresentaram um aumento de massa em relação as vetor selvagem, o que caracteriza inclusão do inserto de interesse no vetor.

Dos clones obtidos, foi escolhido um, o qual foi submetido a um ensaio de restrição (Figura 8) e sequenciamento. As construções foram sequenciadas e confirmou-se que as sequências estavam em fase de leitura correta e não possuíam quaisquer tipos de mutações.

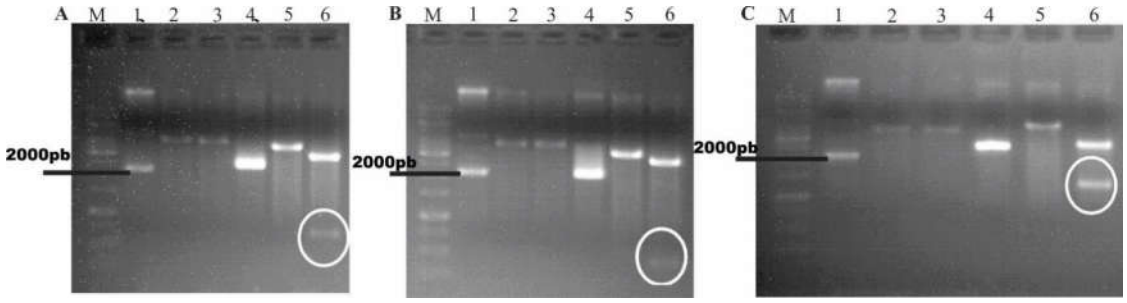


Figura 8 - Análise dos fragmentos de DNA após ensaio de restrição das construções pAE/Insertos em gel de agarose 1%. M- Marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) A) LIC13059 B) LIC10879 e C) LIC13002. Sendo 1: plasmídeo circular (pAE); 2: plasmídeo circular digerido com *XhoI*; 3: plasmídeo circular digerido com *XhoI* e *HindIII*; 4: pAE/inserto fechado; 5: pAE/inserto digerido com *XhoI;* 6(A) pAE/inserto digerido com *XhoI* e *HindIII* e a liberação do inserto em 636pb; 6(B) pAE/inserto digerido com *XhoI* e *HindIII* e a liberação do inserto em 397pb; 6(C) pAE/inserto digerido com *XhoI* e *HindIII* e a liberação do inserto em 1326pb.

4.4 Expressão das proteínas recombinantes

Após a construção do vetor pAE com os genes de interesse, seguiu-se o trabalho de obtenção das proteínas recombinantes envolvidas neste projeto. Foi realizada a indução da expressão em cepas de *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS, utilizando IPTG como indutor em concentrações crescentes (0,01; 0,1 e 1 mM), conforme item 3.10.

As bactérias competentes foram transformadas e cultivadas até a fase *log* para a indução da expressão dos plasmídeos recombinantes. Após indução, as bactérias foram centrifugadas e lisadas por sonicação em banho de gelo. As frações proteicas obtidas (sobrenadante e sedimento) foram analisadas em gel de SDS-PAGE 12% e 15% (Figura 9).

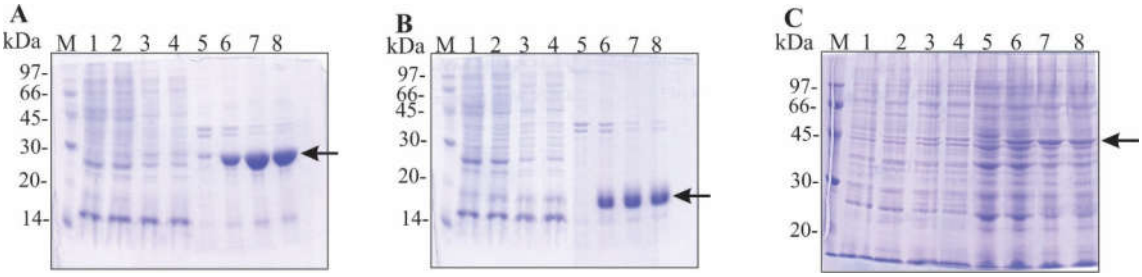


Figura 9 - Análise da expressão das proteínas recombinantes em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. A) Gel a 12%, rLIC13059 aparente nas frações insolúveis. B) Gel a 15%, rLIC10879 aparente nas frações insolúveis. C) Gel a 12%, rLIC13002 banda de intensidade fraca tanto nas frações solúveis quanto nas insolúveis. M: padrão de massa molecular. 1. Sobrenadante não induzido; 2. Sobrenadante induzido com 0,01mM de IPTG; 3. Sobrenadante induzido com 0.1mM de IPTG; 4. Sobrenadante induzido com 1mM de IPTG; 5. Fração insolúvel não induzida; 6. Fração insolúvel induzida com 0.01mM de IPTG; 7. Fração insolúvel induzida com 0.1mM de IPTG; 8. Fração insolúvel induzida com 1mM de IPTG.

Foi feito um ensaio de *Western blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-His para confirmar a expressão das proteínas recombinantes (Figura 10).

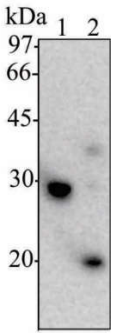


Figura 10 - Ensaio de *Western blotting* das proteínas recombinantes utilizando anticorpo anti-his. As frações de interesse foram aplicadas a um gel SDS-PAGE e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-his conjugado com peroxidase (1:10.000) para detecção das proteínas recombinantes. Tem-se as proteínas recombinantes após a purificação (1) rLIC13059 e (2) rLIC10879.

Pela análise da figura 10, tem-se as proteínas recombinantes após a purificação, mostrando bandas majoritárias de reconhecimento pelo anticorpo monoclonal anti-His.

Na Tabela 3 estão descritos o resultado dos cálculos de massa molecular e pI teórico das proteínas recombinantes que foram realizados a partir da composição de aminoácidos do cassete de expressão, utilizando o programa ProtParam (GASTEIGER, 2006).

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

Gene ID	Massa molecular (kDa)	pI teórico
LIC13059	25,61	6,07
LIC10879	16,13	6,58
LIC13002	49,57	8,33

NOTA: Gene ID: identificação do gene no genoma *L. interrogans* sorovar Copenhageni

4.5 Purificação, diálise e análise da estrutura secundária das proteínas recombinantes

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

Como todas as proteínas foram expressas na forma insolúvel, como corpúsculo de inclusão, estas foram solubilizadas em tampão de desnaturação, contendo 8M ureia. A amostra foi passada na coluna de purificação com *Chelating Sepharose* e sucedeu a passagem de sucessivos tampões de renaturação, diminuindo a concentração de ureia para 1M. Após a renaturação, seguiu-se as lavagens com tampões Tris/NaCl pH 8,0 com quantidades crescentes de imidazol (5, 20, 40 e 60 mM) com o intuito de retirar contaminantes proteicos da amostra de proteína recombinante. A eluição se deu com o mesmo tampão, porém na concentração de 1M de imidazol, conforme item 3.11. Nesta etapa, foi interrompida a continuidade do estudo com a rLIC13002, a qual não foi possível purificar pelos métodos laboratoriais disponíveis.

Após diálise em tampão fosfato 0,1% glicina, para a retirada de imidazol a concentração das proteínas recombinantes foi estimada pela comparação destas com concentrações pré-estabelecidas de BSA, com uso do software GelQuant (DNR Bio-Imaging Systems Ltda), que utiliza relações de densitometria para estimar a massa das bandas de interesse. As concentrações foram de 1,13 µg/µL para rLIC13059, 0,72 µg/µL para rLIC10879. Contudo, tem-se 3,76 e 2,4 µg de proteína recombinante por litro de cultura induzida para a rLIC13059 e para a rLIC10879, respectivamente.

Como esperado, bandas majoritárias de cerca de 25 e 16 kDa correspondentes as proteínas rLIC13059 e rLIC10879, respectivamente, foram observadas em SDS-PAGE (Figura

11A). Inclusive, nesta mesma figura, é possível verificar a tendência da rLIC10879 em formar dímeros.

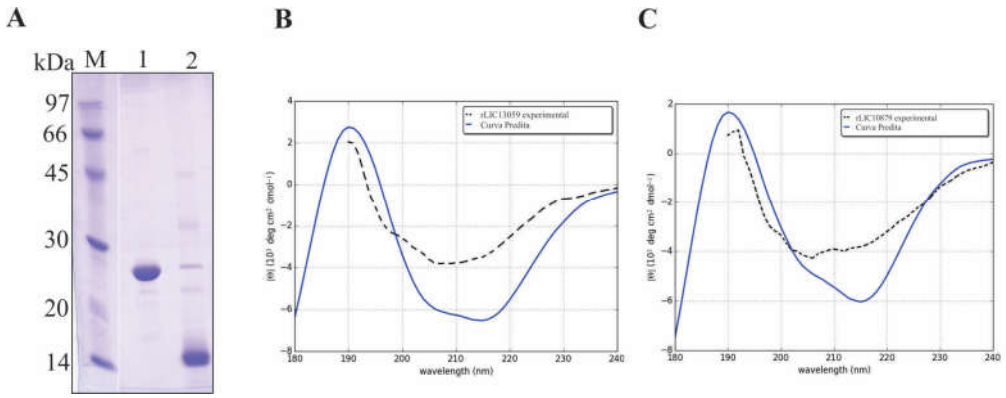


Figura 11 - (A) Análise das proteínas recombinantes purificadas por SDS-PAGE. M: massa molecular. 1- Banda referente a proteína recombinante LIC13059, 25,6 kDa. 2- Banda referente a proteína recombinante LIC10879, 16 kDa. **Análise de dicroísmo circular (B) proteína rLIC13059**, tracejado dados experimentais e na linha continua os dados preditos pela análise da sequência de aminoácidos no software CAPITO. **(C) proteína rLIC10879.** Medidos à 20ºC em espectropolarímetro, sendo apresentada a média de cinco medidas.

Com a obtenção das proteínas recombinantes purificadas, sucedeu-se o dicroísmo circular (CD) para verificar se após o processo de desnaturação (pois as proteínas recombinantes estavam em corpúsculo de inclusão), renaturação e purificação elas apresentavam a conformação esperada. O CD é uma técnica que permite o estudo dos elementos (α-hélice, folha-β e estruturas randômicas) de estrutura secundária das proteínas em solução, os quais contribuem para a formação da estrutura terciária.

Foram obtidos cinco espectros para cada recombinante e feito uma média, sendo esta, analisada pelo programa CAPITO (WIEDEMANN; BELLSTEDT; GORLACH, 2013). Foi possível verificar que ambas as proteínas demonstraram um perfil estruturado, apresentando estrutura secundária predominantemente randômica e folha-β (Tabela 4, figuras 11B e C).

Tabela 4 - Análise dos espectros de CD pelo programa CAPITO.

Proteína	Folha-β	Randômico	α-hélice

rLIC13059	37%	57%	1%
rLIC10879	42%	59%	6%

4.6 Avaliações imunológicas

Após a obtenção das proteínas purificadas e em sua conformação estrutural, camundongos BALB/c foram imunizados pela via subcutânea com 10 µg de proteína recombinante, adsorvidos em 2% *Alhydrogel*, utilizado como adjuvante. O uso de substâncias adjuvantes ou imunomuduladores pode aumentar a resposta imune. Os adjuvantes induzem inflamação local e aumentam a expressão de moléculas coestimuladoras e produção de citocinas, principalmente a IL- 12 que estimula o crescimento e a diferenciação dos linfócitos T (KALIL; CUNHA-NETO; GUILHERME, 2008).

O protocolo foi de uma imunização a cada 15 dias até completarem 3 imunizações. A presença de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes nos soros dos camundongos foi avaliada a cada 15 dias, após a aplicação de cada dose, por sangria retro-orbital. Foi observado um aumento no título de anticorpo com o passar dos reforços de doses.

Todas as proteínas promoveram altos títulos nos animais imunizados, sendo a proteína rLIC13059 a mais imunogênica ao final de três imunizações, com o título de 409.000, enquanto a rLIC10879 apresentou título de 153.600. Não foi detectada reatividade do soro dos animais controle (imunizados com PBS e adjuvante). Os anticorpos gerados foram capazes de reconhecer as proteínas recombinantes, o que é demonstrado pela presença de uma banda majoritária referente a cada proteína no ensaio de *Western blotting* (Fig. 12B).

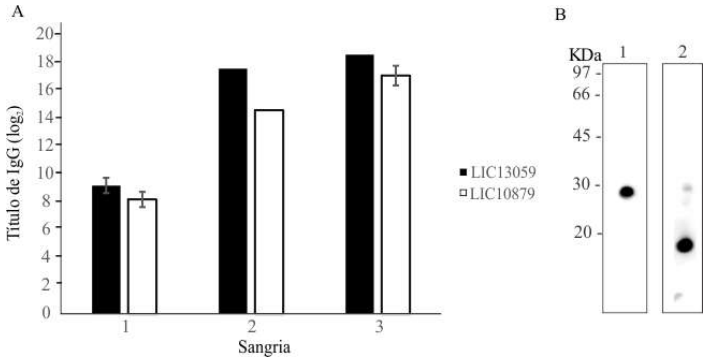


Figura 12 - Produção de IgG pela imunização de camundongos BALB/c com as proteínas recombinantes. **(A)** Em placa de ELISA foram imobilizados 250 ng por poço de proteína recombinante. A placa foi incubada com o antissoro obtido após cada sangria de cada animal, numa diluição de 1:200 e então foi feita uma diluição seriada até 1:409600. Então a interação entre a proteína e o antissoro produzido foi sondada utilizando anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000. O título foi considerado a máxima diluição que apresentou uma absorbância maior que 0,1. Os dados estão expressos em logaritmo de base 2. **(B)** Visualização das proteínas recombinantes por *Western Blotting* usando antissoro produzido pela imunização de camundongos. 1- rLIC13059. 2- rLIC10879. 0,5µg de cada recombinante foram aplicados em gel de SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada com o antissoro na proporção de 1:500, lavada e posteriormente incubado com anticorpos anti-IgG de camundongos, conjugado com peroxidase, na proporção de 1:5000. A reação foi revelada por quimioluminescência (ECL).

Foi avaliada também a capacidade dessas proteínas recombinantes de estimular os esplenócitos de camundongos primados com essas proteínas recombinantes, pois, a ativação de células T pode favorecer a ativação de linfócitos B. Dessa forma, gerariam células de memória que são fundamentais para a montagem de uma resposta mais rápida na segunda exposição ao antígeno (KALIL; CUNHA-NETO; GUILHERME, 2008).

As proteínas recombinantes induziram uma resposta celular, pois houve proliferação dos esplenócitos quando estes foram estimulados *in vitro* pelos antígenos (fig. 13). A proliferação foi expressiva para as células obtidas do grupo imunizado com rLIC13059 e pouco expressiva para o grupo rLIC10879. Entretanto, ao analisar o resultado em conjunto, observamos que apesar da expressiva resposta das células do baço *in vitro* dos animais do grupo LIC13059 quando estimuladas com a LIC13059, houve também proliferação quando estimuladas com a LIC10879, concluindo que a resposta não é específica para o estímulo. A reação teve como controle positivo a Concavalina A, um mitógeno, o qual estimulou fortemente as células do baço a se multiplicarem, gerando uma absorbância de aproximadamente 2 (dados não mostrados).

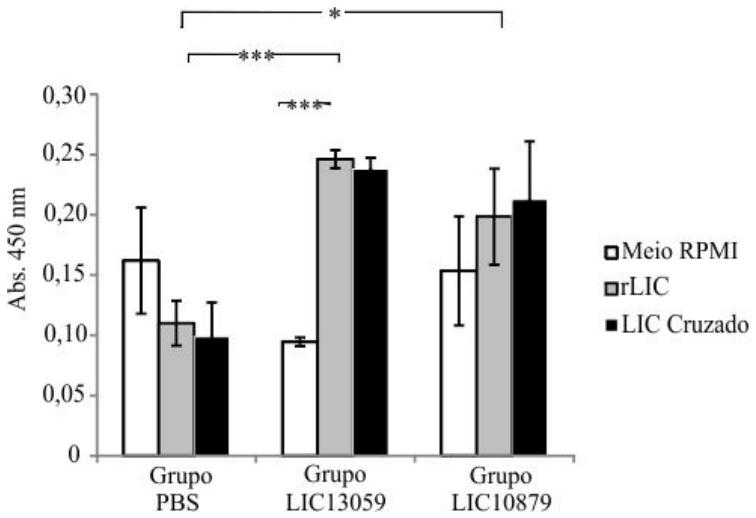


Figura 13 - Avaliação das respostas celulares apresentada pelos camundongos imunizados com as proteínas recombinantes. A proliferação de linfócitos foi analisada a partir de células de baço de camundongos imunizados com PBS (animais controle), LIC13059 e LIC10879. As células foram cultivadas e então estimuladas com meio RPMI (controle negativo), mitógeno ConA (controle positivo, 5µg/mL, dados não mostrados) ou proteína (5 µg/mL). A resposta de proliferação foi medida pelo ensaio colorimétrico ELISA BrdU. Os valores representam o valor de OD ±desvio padrão de dois experimentos independentes. As comparações para análise estatística foram feitas pelo teste t-Student entre o tratamento proteína e meio, dentro do grupo dos animais imunizados (*$p<0,05$ e ***$p<0,001$).

4.7 Reatividade da proteína recombinante com soro de pacientes

As proteínas recombinantes foram colocadas em contato com soros de pacientes acometidos com leptospirose com o intuito de avaliar se anticorpos presentes nestes seriam capazes de reconhecer os antígenos de estudo. Dessa forma é possível inferir se as proteínas nativas são expressas durante a infecção, produzindo reação imunológica no paciente.

A reatividade das proteínas foi avaliada com amostras de soro de ambas as fases da doença, ou seja, na fase inicial (MAT-) e na fase convalescente (MAT+). Foi testado um total de 20 amostras pareadas para cada recombinante. As amostras foram consideradas reativas quando apresentaram valores maiores do que o estabelecido pelo *cutoff*, calculado a partir da reatividade de um *pool* de soros comerciais, pertencente a indivíduos saudáveis.

Conforme a figura 14, a rLIC13059, quando utilizada como antígeno imobilizado e avaliada a reatividade frente aos soros de pacientes acometidos de leptospirose, apresentaram: 70% e 80% nas fases MAT- e MAT+, respectivamente.

Quando utilizada como antígeno imobilizado, a rLIC10879, apresentou 85% de respondedores no MAT +, relativo ao paciente na fase convalescente da leptospirose, e 80% no MAT-, relativo a fase inicial da doença, porém com baixa densidade óptica.

Os anticorpos IgM também foram avaliados dos soros dos pacientes, entretanto não houve resultados significativos (dados não mostrados).

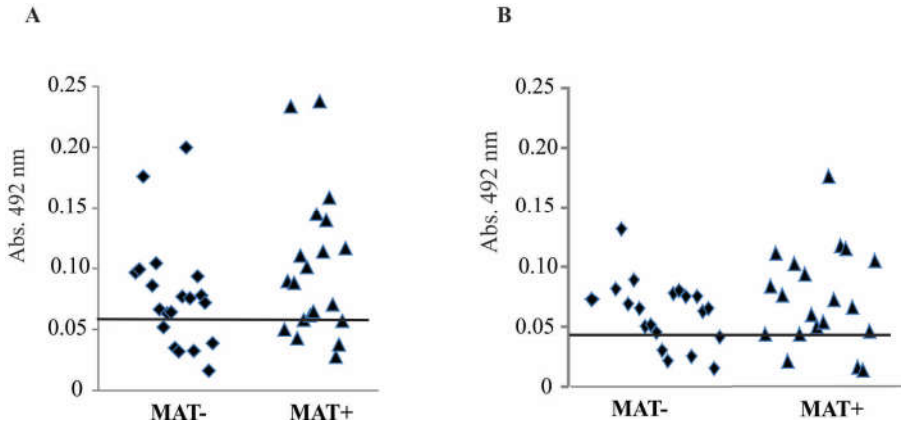


Figura 14 - Reatividade de soro de pacientes diagnosticados com leptospirose com as proteínas recombinantes rLIC13059 e rLIC10879. As proteínas rLIC13059 **(A)** e rLIC10879 **(B)** foram imobilizadas em placa de ELISA (250 ng/poço) e incubadas com soro pareados de pacientes diagnosticados com leptospirose, na fase convalescente (MAT+) e inicial (MAT-), na diluição de 1:100. A detecção da reatividade foi feita por incubação com anti-IgG humano conjugado com peroxidase (1:10.000). Os respondedores são considerados como aqueles acima do *valor cutoff* (linha horizontal), definida como a média somada a três vezes o desvio padrão de 3 amostras de soro de pacientes saudáveis obtidos comercialmente.

Contudo, os resultados obtidos sugerem que as proteínas selecionadas participam em algum momento da infecção e apresentam epitopos que são importantes para o reconhecimento imune dos hospedeiros. Vale a pena ressaltar que o teste diagnóstico padrão atualmente utilizado (teste de aglutinação microscópica) não é capaz de detectar a doença na fase inicial, MAT-, e essas proteínas apresentaram reatividade elevada, principalmente a rLIC10879. Portanto, os dados sugerem o potencial dessas proteínas como marcador diagnóstico.

4.8 Presença das proteínas em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* spp.

Foi avaliada a presença das proteínas nativas LIC13059 e LIC10879 em extratos de *Leptospira* por *Western blotting.*

É possível verificar na figura 15, a reatividade do antissoro produzido contra a proteína recombinante nos diferentes extratos proteicos de leptospiras, detectando a proteína nativa no extrato da bactéria. Esses resultados corroboram com os resultados do filograma, pois a proteína referente à LIC13059 (figura 15A) está presente nas cepas patogênicas, apesar de não ser detectada a proteína nas espécies *L. santarosai* e *L. borgpetersenii,* e ausente na cepa saprofítica

(*L.biflexa* sorovar Patoc). Já para a proteína LIC10879 (Fig. 15B), observa-se a detecção da proteína nativa pelo antissoro produzido contra a proteína recombinante em todas as espécies, exceto na saprofítica *L. biflexa* (45% de identidade, dados *Blast Protein*) e, inusitadamente, foi possível detectar o dímero da proteína nativa em algumas espécies.

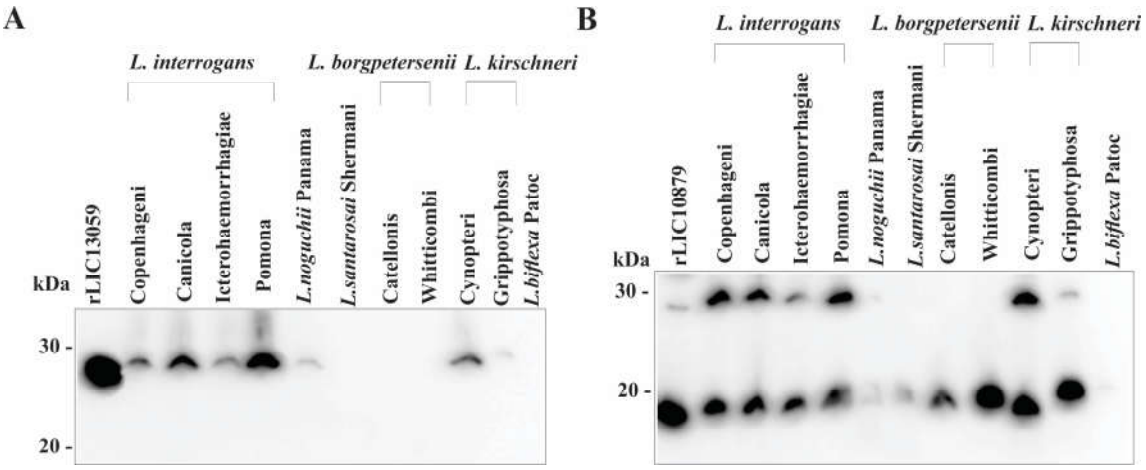


Figura 15 - Detecção da proteína nativa em extratos de *Leptospira* spp. Extratos totais de leptospiras de diferentes espécies e sorovares foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membranas e incubadas com antissoro anti-rLIC13059 (A) ou rLIC10879 (B) (1:500) e então, anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5.000). A reação foi revelada por quimioluminescência (ECL).

4.9 Ensaios de localização

Foram realizados ensaios de localização celular para verificar se as proteínas codificadas pelos genes LIC13059 e LIC10879 estão localizadas na membrana externa da bactéria. Para esse fim, foram realizados experimentos de acessibilidade por proteínase K e ELISA de bactéria intacta.

4.9.1 Acessibilidade à proteínase K (PK)

A avaliação da clivagem proteolítica de proteínas expostas se dá com a incubação da bactéria intacta e viáveis com a PK, uma serino protease de amplo espectro. Logo após a exposição, faz-se um extrato proteolítico de bactéria, separa-se em SDS-PAGE, transfere para nitrocelulose e incuba com o antissoro produzido para cada proteína recombinante.

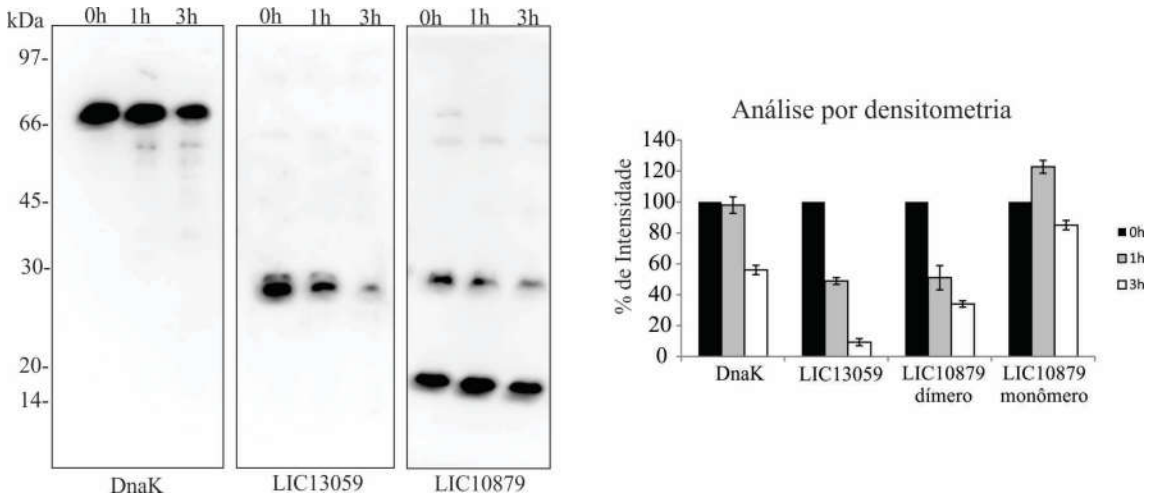


Figura 16 - *Western Blotting* para avaliação da acessibilidade da PK. Culturas de *L.interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 foram colocadas em contato com 40 µg de PK em tampão de proteólise e a reação foi interrompida depois de diferentes tempos, com PMSF. Centrifugou e ressuspendeu o *pellet* em PBS*ls*. Quantificou em microscópio de campo escuro para normalização da quantidade nas diferentes amostras. Foi adicionado tampão de SDS-PAGE e aquecido a 96ºC. Aplicou-se no gel de poliacrilamida e transferiu-se para membrana de nitrocelulose. A detecção da proteína nativa na bactéria foi feita com antissoro específico para cada amostra, anti-DnaK (proteína citoplasmática), anti-rLIC13059 e anti-rLIC10879, e posteriormente detectado com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Revelado por quimioluminescencia e detectado em aparelho Carestream. **Análise por densitometria.** Realizada por quantificação dos pixels no programa GelQuant. A porcentagem de integridade foi medida em relação à amostra 0h.

Dessa forma, pode-se observar que o controle negativo de degradação, a DnaK, proteína citoplasmática, apresenta pouca degradação após 3 h de incubação, confirmando que é uma proteína não exposta (GUERREIRO et al., 2001) porém sugere-se também a incubação prolongada com a PK pode ter prejudicado a integridade dessas bactérias. Já a proteína codificada pelo gene LIC13059 mostrou-se exposta, sendo observada degradação da mesma após exposição das bactérias à serino protease. Diferentemente, para a proteína codificada pela LIC10879, observa-se que o monômero de 16 kDa não é degradado pela PK, indicando que não é exposto; já o dímero de 32 kDa sofreu degradação expressiva, nos levando a concluir que a proteína exposta encontra-se na forma de dímero. Pela análise de densitometria das bandas obtidas pelo *western blotting* após uma hora, verifica-se a porcentagem de integridade das proteínas nativas, sendo de aproximadamente 50% para a LIC13059 e para o dímero da LIC10879; não foi verificada a redução de sinal de detecção para o monômero da LIC10879 e nem para o controle negativo da reação.

4.9.2 ELISA de bactéria intacta para detecção de antígeno na superfície

Para avaliação da localização celular das proteínas em estudo, em placa de ELISA foi imobilizada cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 (atenuada por passagens em cultura) a qual foi incubada com antissoro policlonal para cada proteína (1:500) (anti-rLIC13059 e anti-rLIC10879). Para detecção foi utilizado anti-IgG de camundongo (1:5000) conjugado com peroxidase. Como controle, foi ocultado um dos componentes do sistema.

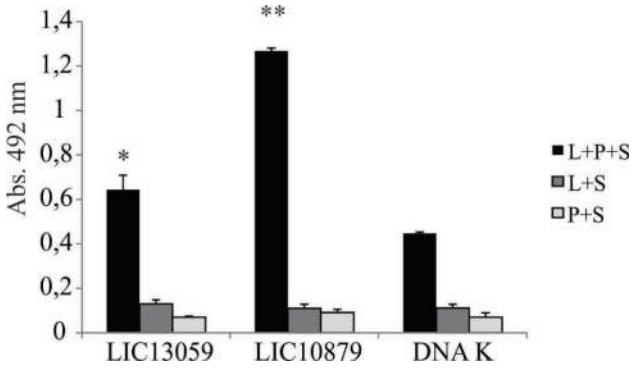


Figura 17 - Ensaio de ELISA de bactéria intacta detectado com antissoro contra cada proteína recombinante. Em placa de ELISA foram imobilizadas *Leptospiras* na concentração de 10^9/mL em tampão PBS*ls*. Então foram adicionados os antissoros respectivos de cada proteína recombinante, exceto em um tratamento (L+S) e foi adicionado o anticorpo contra IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Os termos utilizados foram, L para *Leptospira,* P para anticorpo primário (anti-recombinante) e S para o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Para análise estatística, foi realizado teste t-Student, em comparação com o ensaio de DnaK (*p<0,05 e **p<0,0002).

Observa-se pelo gráfico da figura 17 que a proteína codificada pela LIC10879 é mais abundante, visto a maior absorbância em relação à DnaK, proteína citoplasmática que não é detectada na superfície da bactéria. Já a proteína codificada pela LIC13059, apesar de um sinal menor, é também considerada exposta, pois pela análise estatística realizada, o resultado é significantemente maior do que o controle negativo, DnaK.

4.10 Ensaios com componentes do hospedeiro

Inicialmente foram realizados ensaios de interação das proteínas recombinantes com componentes da matriz extracelular (MEC), componentes do plasma do hospedeiro e com um receptor de superfície de célula de mamífero, a e-caderina. Após identificar os componentes do hospedeiro que interagiram com as recombinantes, foi definida a afinidade da recombinante ao componente, pelo cálculo da constante de dissociação, K_D. No entanto para algumas interações

não foi possível determinar o K_D, pois a interação não foi saturável, apesar de ser dose-dependente.

A caracterização da ligação a laminina se deu por oxidação dos resíduos de açúcar da laminina e a influência na ligação à recombinante. Além disso, foi a interação com esse componente que gerou os nomes dados às proteínas recombinantes em estudo, sendo a rLIC13059 denominada Lsa25.6 e a rLIC10879 denominada Lsa16, proveniente de ***L****eptospira* ***s****urface* ***a****dhesin* seguida pelo massa molecular de cada recombinante, em kDa.

Nosso laboratório descreveu a primeira proteína de *Leptospira* que se liga a laminina, a Lsa24 (BARBOSA et al., 2006). Depois dessa, muitas outras proteínas foram descritas, sendo as mais atuais: Lsa44 e Lsa45 (FERNANDES et al., 2014), Lsa32 (DOMINGOS et al., 2015), Lsa37 (SILVA et al., 2016), Lsa14 e Lsa19 (FIGUEREDO et al., 2016).

Para avaliar se a ligação do PLG se dá entre os domínios *Kringle* do PLG e os resíduos de lisina das proteínas recombinantes, foi caraterizada a ligação ao plasminogênio (PLG) via ácido aminocapróico (ACA). Foi avaliada também a capacidade do PLG, na superfície da bactéria, transformar-se em PLA (serino protease) quando na presença do uPA. Essa determinação se deu de forma indireta pela degradação do substrato cromogênico pela PLA gerada. Ademais foi avaliada a capacidade de cada recombinante em recrutar o PLG presente no soro humano normal comercial.

Como as duas recombinantes interagiram com o fibrinogênio, foi avaliada a capacidade de inibir a formação do coágulo de fibrina, quando colocado fibrinogênio e trombina na presença de cada recombinante separadamente. Somente a Lsa25.6 foi capaz de inibir a formação do coágulo de fibrina.

Por fim, foi avaliada a interação com o receptor de superfície de célula de mamífero, a e-caderina, e somente a Lsa16 apresentou alta absorbância nessa interação. Sugerindo então ser um ligante desse receptor que pode desencadear uma sinalização para dentro da célula e a perda da integridade intercelular (EVANGELISTA et al., 2014), o que facilitaria a disseminação da bactéria pelos tecidos.

4.10.1 Interação das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular (MEC), plasma e receptor de célula de hospedeiro

A adesão das *Leptospiras* aos componentes do tecido do hospedeiro é entendida como um passo inicial e necessário para a infecção e patogênese da bactéria. A ligação às células do hospedeiro e a componentes da matriz extracelular é necessária para que a bactéria consiga penetrar, disseminar-se e persistir nos tecidos.

Dessa forma, as proteínas recombinantes foram avaliadas quanto à sua capacidade de interação com componentes da matriz extracelular, com um receptor celular e com componentes do plasma. Como controle de ausência de interação, foram empregados gelatina, BSA e fetuína (componente altamente glicosilado). Observa-se, pela figura 18, que todos os controles apresentaram baixos valores de absorbância.

Para isso, foi imobilizado um micrograma de cada componente em placa de ELISA, com exceção da e-caderina que foi imobilizado 0,5 µg/poço, e incubado com um micrograma de proteína recombinante por 2 horas a 37 ºC. Após lavagens, as proteínas ligadas foram detectadas pelo anticorpo policlonal seguido de anti-IgG conjugado com peroxidase, que confere cor a solução. Para confirmar a ligação, o experimento foi repetido e detectado com o anticorpo monoclonal anti-His, o qual já é conjugado com a peroxidase.

A proteína Lsa25.6 (fig. 18A) mostrou interação significante com laminina, plasminogênio e fibrinogênio. Já a Lsa16 (fig. 18B) mostrou interação significativa com laminina, plasminogênio, fibrinogênio, C4BP e fatores do complemento. As duas proteínas recombinantes mostraram interação forte com o plasminogênio.

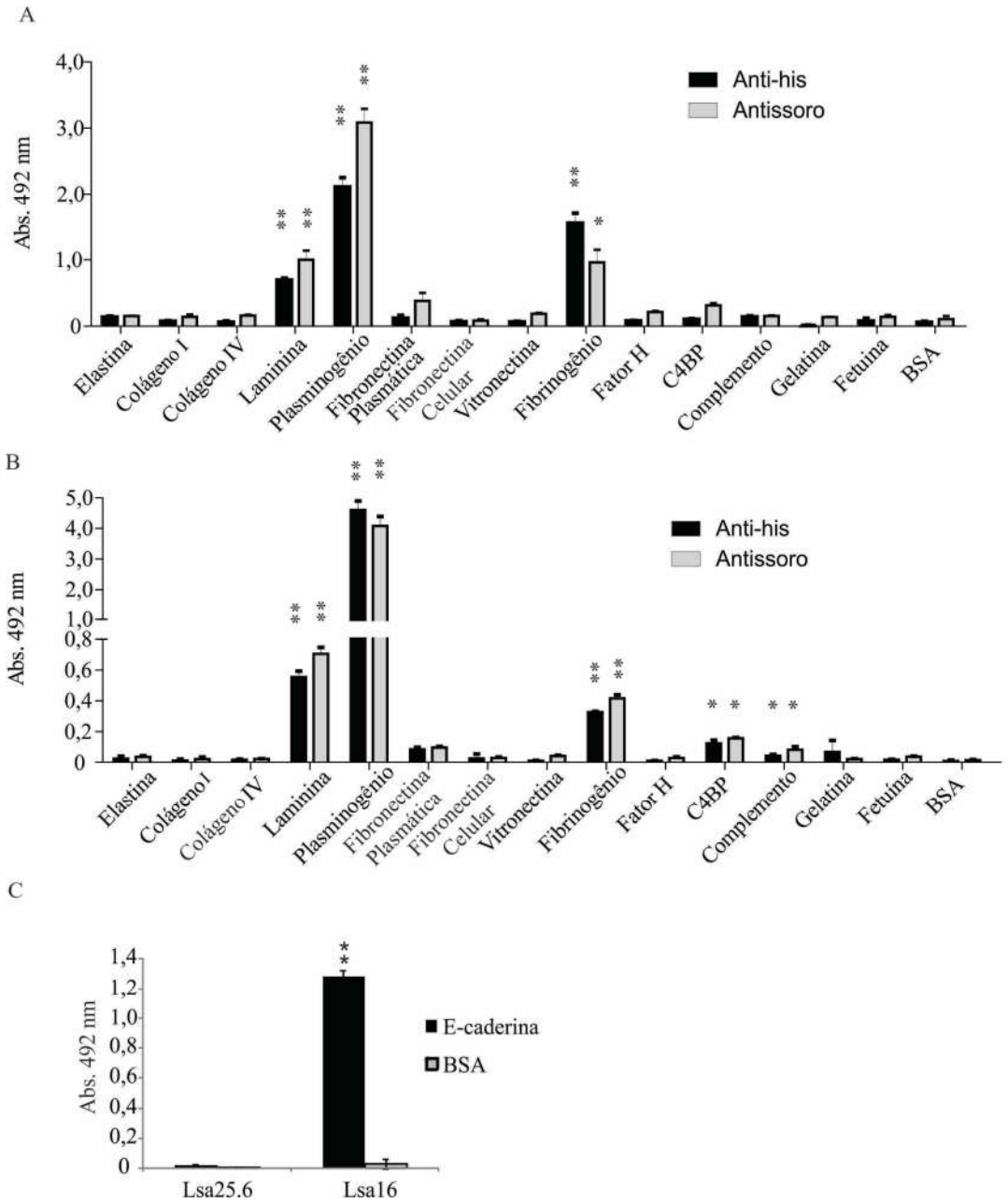


Figura 18 - Avaliação da interação das proteínas recombinantes com componentes da matriz extracelular e componentes do soro. (A) Lsa25.6 **(B)** Lsa16. Placas de ELISA foram imobilizadas com 1 µg de elastina, colágeno tipos I e IV, laminina, plasminogênio, fibronectina celular e plasmática, vitronectina, fibrinogênio, fator H , C4BP, componentes do complemento e com os controles negativos gelatina, fetuína e BSA. Então, 1 µg da proteína recombinante foi adicionado por poço e as placas foram incubadas por 2 h a 37 ºC. A detecção da ligação foi feita através da incubação com antissoro anti-proteína recombinante (1:2000), seguida de incubação com anti-IgG de camundongo (1:5000). Em outra placa, preparada igualmente, foi detectada com anti-his (1:10.000). Em **(C)** temos a interação das recombinantes com e-caderina. Foi imobilizado 0,5 µg do componente e então foi incubado 1 µg das proteínas recombinantes. A detecção foi realizada com anti-his (1:10.000). Os dados representam o valor da média ± desvio padrão de uma triplicata, e são representativos de três experimentos independentes. Para análise estatística, a ligação das proteínas recombinantes a cada componente foi comparada aos controles negativos, embora o p-valor apresentado neste gráfico se refira à comparação com o BSA, pelo teste t-Student (*$p<0,05$ e **$p<0,01$).

Posteriormente, foi avaliada a interação das proteínas recombinantes à e-caderina, um receptor de superfície de células de mamíferos, principalmente células epiteliais, responsável por manter a junção célula-célula integra, por ancoragem intercelular. Já foi descrito (EVANGELISTA et al., 2014) que somente espécies patogênicas possuem a capacidade de se ligar às caderinas. Interessantemente, a Lsa16 mostrou forte interação com a e-caderina (fig.18C). Portanto, é sugerido que essa proteína, na superfície da bactéria, participe de forma efetiva no processo de invasão dos tecidos.

4.10.2 Curva de dose-resposta

Para definir a afinidade da ligação das proteínas recombinantes aos componentes, foi feito um ensaio de dose-resposta, no qual o componente imobilizado foi incubado com concentrações crescentes da proteína recombinante.

Observa-se nos gráficos da figura 19 que as proteínas recombinantes apresentaram ligação dose-dependente e saturável a todos componentes mostrados, sendo eles: laminina, plasminogênio e fibrinogênio, exceto na ligação do fibrinogênio com a Lsa25.6 que não apresentou saturação, por isso não se pôde calcular a constante de dissociação. A ligação da Lsa16 à e-caderina não foi saturável, assim como sua ligação ao fibrinogênio. Já a interação com outros componentes com densidade ótica baixa não apresentaram ligação dose-dependente, como no caso do C4BP. Os valores da constante de dissociação (K_D) estão apresentados na Tabela 5.

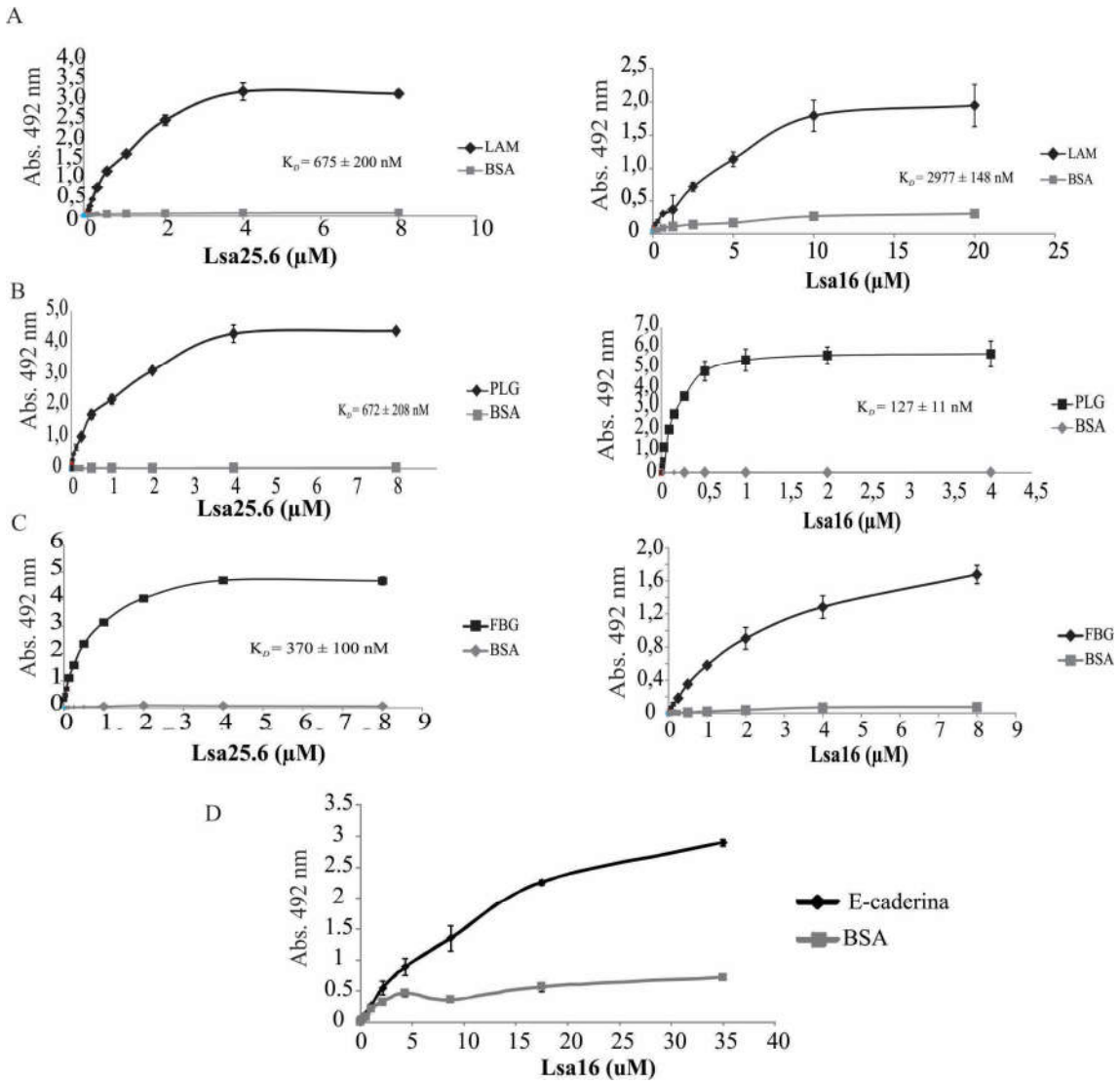


Figura 19 - Curvas de dose-resposta da ligação das proteínas recombinantes aos componentes (A) Laminina, **(B)** Plasminogênio, **(C)** Fibrinogênio e **(D)** E-caderina. Os componentes imobilizados foram incubados com concentrações crescentes das proteínas recombinantes; cada ponto foi feito em triplicata e expresso como a média ± o desvio padrão. O BSA foi incluído como um controle negativo. Os gráficos expressam valores de absorbância x concentração de proteína recombinante em µM. A detecção da ligação foi feita por incubação com anti-his (1:10.000) e detecção por OPD, a leitura foi realizada em 492 nm.

Tabela 5 - Constantes de dissociação (K_D) das proteínas recombinantes e ligantes.

Proteína/ Componente	Laminina K_D (nM)	Plasminogênio K_D (nM)	Fibrinogênio K_D (nM)
Lsa25.6	675 ± 200	678 ± 208	370 ± 100
Lsa16	2977 ± 148	127 ± 11	Não saturável

Quanto aos componentes da matriz extracelular, Lsa25.6 e Lsa16, ao contrário de algumas proteínas que são apenas ligantes de laminina, como Lsa24 (BARBOSA et al., 2006) e Lsa20 (MENDES et al., 2011), mostraram um espectro maior de ligantes, o que também ocorre para outras proteínas, como Lsa21 (ATZINGEN et al., 2008), LipL32 (HOKE et al., 2008), TlyC (CARVALHO et al., 2009), OmpL37 (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010), Lsa66 (OLIVEIRA et al., 2014) e Lsa30 (SOUZA et al., 2012). Os valores de K_D apresentados pela Lsa25.6 em relação à laminina são baixos quando comparados a Lsa16, entretanto, quando comparada outras adesinas já publicadas, apresenta valores de K_D intermediários. Já a Lsa16 apresentou um K_D de aproximadamente 3000 nM em relação a laminina, o que caracteriza uma baixa especificidade de ligação.

Contudo, a cinética de dose-dependência de cada ligante à proteína Lsa25.6 é específica e uma ligação saturável aos componentes imobilizados foi observada, satisfazendo as propriedades de uma interação típica receptor-ligante. Já para a Lsa16, a cinética de dose-dependência, apesar de saturável em alguns casos, apresentada altos valores de K_D , o que caracteriza baixa especificidade de ligação, exceto quando se trata da ligação ao plasminogênio, com baixo K_D e alta afinidade ao componente.

A afinidade da proteína Lsa16 ao plasminogênio é alta em comparação a Lsa25.6 e algumas proteínas ligantes de plasminogênio como OmpL1 (FERNANDES et al., 2012), Lsa20 (MENDES et al., 2011). Já em comparação a outros ligantes de plasminogênio, como Lsa26, Lsa23 , Lsa36 (SIQUEIRA et al., 2013), Lsa46 (TEIXEIRA et al., 2015), Lsa66 (OLIVEIRA et al., 2014) apresenta uma afinidade menor e K_D relativamente maior.

Pela primeira vez no nosso grupo, foi constatado a interação de uma proteína recombinante à um receptor de superfície, do tipo caderina (fig. 19 D). A interação da Lsa16 à e-caderina apresentou ligação dose-dependente entretanto não saturável. É um resultado interessante, visto que essa molécula é responsável pela integridade do tecido e é sugerido que uma ligação a este componente, *in vivo*, pode desencadear uma sinalização em cascata para dentro de célula e consequente perda da integridade do tecido (EVANGELISTA et al., 2014), o que facilitaria a disseminação da bactéria e caracterizaria um mecanismo de patogênese.

4.10.3 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes à laminina

A laminina, uma proteína heterotrimérica de aproximadamente 800 kDa, é um componente funcional principal da matriz extracelular, contribuindo para o desenvolvimento e manutenção do tecido. A arquitetura única da laminina não é atualmente passível de

determinação em alta resolução, uma vez que os seus segmentos flexíveis e estreitos complicam tanto a cristalização como a reconstrução de uma única partícula por microscopia eletrônica (ARMONY et al., 2016).

Como citado anteriormente, a adesão das recombinantes à laminina foi caracterizada. Para isso, foi utilizado o metaperiodato de sódio, o qual oxida os resíduos de glicídicos da laminina. As proteínas recombinantes foram colocadas em contato com a laminina oxidada e a ligação da laminina integra (0 mM de metaperiodato de sódio) com a recombinante foi comparada com a ligação da laminina tratada com diferentes concentrações do agente oxidante (1,6 – 100 mM de metaperiodato de sódio) com a recombinante.

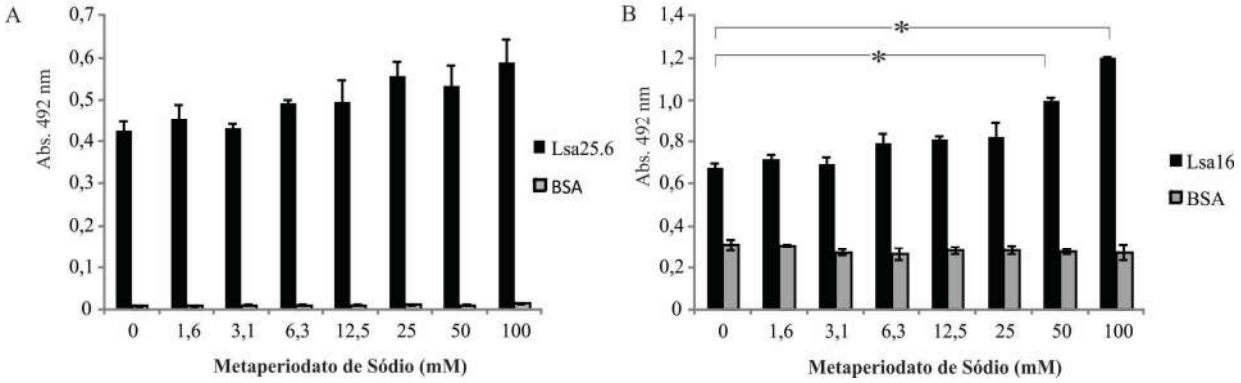


Figura 20 - Participação dos resíduos de carboidratos da laminina na ligação com as proteínas recombinantes. Um micrograma por poço de laminina foi imobilizado em placa de ELISA e tratado com concentrações crescentes de metaperiodato de sódio (0 – 100 mM), por 15 min a 4 ºC, para a oxidação dos carboidratos presentes na laminina. Depois, foi adicionado 1µg/poço das proteínas recombinantes, **(A)** Lsa25.6 e **(B)** Lsa16. A detecção foi feita por anti-his conjugado com peroxidase. Os valores representam a média de uma triplicata de absorbâncias em 492 nm ± desvio padrão. Representativo de dois experimentos independentes. Para os cálculos estatísticos a ligação das proteínas recombinantes à laminina sem tratamento com metaperiodato de sódio foi comparado aos pontos em que houve tratamento, pelo teste t-Student ($p<0,05$).

Pela figura 20 observa-se que somente a Lsa16 apresentou diferença na ligação após o tratamento da laminina com metaperiodato de sódio. Pode-se inferir que o tratamento com o agente oxidante altere a estrutura da laminina, expondo sítios de ligação à Lsa16, e portanto aumentando a ligação da recombinante no componente.

4.10.4 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio

Já está bem estabelecido que os domínios *kringle* do plasminogênio frequentemente interajam com resíduos de lisina em receptores de diversas bactérias (LÄHTEENMÄKI; KUKKONEN; KORHONEN, 2001). Estes domínios também participam da ligação do

plasminogênio à *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1-130, uma vez que o análogo de lisina, ácido aminocapróico (ACA), quase inibiu totalmente a interação entre a bactéria e o plasminogênio (VIEIRA et al., 2009). Baseado nessas referências, a participação dos resíduos de lisina na ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio foi avaliada.

A interação entre as proteínas e o plasminogênio foi bastante reduzida pela adição do análogo de lisina (Figura 21), sugerindo que a ligação entre estes se deve principalmente pela interação entre os domínios *kringle* do plasminogênio e os resíduos de lisina presentes nas proteínas.

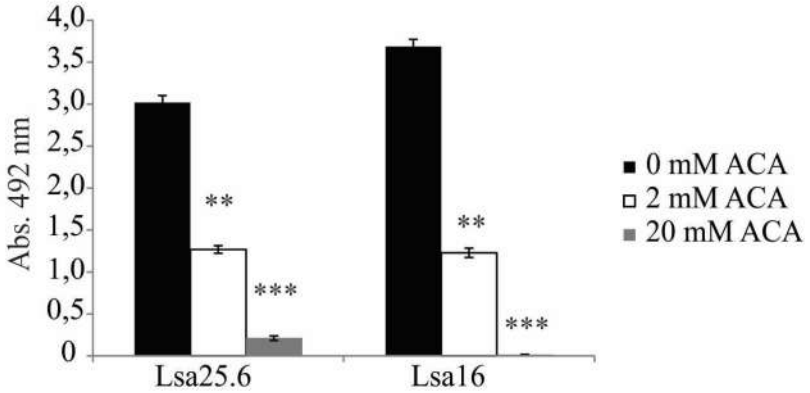


Figura 21 - Influência dos resíduos de lisina na ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio. Plasminogênio (1 µg/poço) foi imobilizado, e então foram adicionadas as proteínas recombinantes (1 µg/poço), coincubadas com ácido aminocapróico (ACA, 2 e 20 mM). Após interação, a detecção da ligação das proteínas ao plasminogênio foi feita por meio da utilização de anti-his (1:10.000), conjugado com peroxidase. A verificação da significância da redução foi feita por meio do teste t-Student, em comparação com o tratamento sem inibição (**p<0,001 e ***p<0,0005).

4.10.5 Conversão do plasminogênio à plasmina

Plasmina (PLA) é o componente central do sistema fibrinolítico, com a função principal de clivar fibrina. É uma serino-protease de amplo espectro, contribui para vários processos fisiológicos e patogênicos, incluindo migração celular, remodelamento de tecido, trombólise, cicatrização de feridas e progressão de câncer. O plasminogênio (PLG) é uma glicoproteína produzida no fígado e presente em altas concentrações no plasma (~2 µM). Este é convertido em plasmina pela clivagem de uma ligação peptídica pelo ativador de plasminogênio do tipo tecidual (tPA) ou pelo ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA). tPA é produzido principalmente por células endoteliais e conduz a ativação da fibrinólise no sangue. Já o uPA é produzido por muitos tipos celulares e é o principal ativador associado com a membrana celular (VIEIRA; NASCIMENTO, 2015).

Estudos sugerem que espiroquetas não apresentam mecanismos endógenos para ativação do PLG. *Borrelia* e *Leptospira* adquirem PLA in vitro somente por adição de fatores exógenos. Entretanto, foi mostrado que leptospiras estimulam células endoteliais in vitro a produzir e secretar altos níveis de uPA e tPA, o que foi demonstrado pelo soro de pacientes doentes apresentar níveis elevados de ambos ativadores quando comparado a pacientes saudáveis. A ligação do PLG às espiroquetas é um fenômeno muito difundido, uma vez que varias espécies de organismos estudados pode interagir com essa molécula do hospedeiro. Leptospiras expressam proteínas que interagem com o PLG, exibindo uma expressão diferencial entre bactéria atenuada e virulenta, sugerindo a participação de fatores de virulência na aquisição do PLG. A associação de PLA com a superfície externa da leptospira conduz a clivagem proteolítica de fibronectina e laminina, que são constituintes da membrana basal. Dessa forma, leptospiras são patógenos altamente invasivos que podem penetrar pela pele úmida intacta ou ferida para iniciar a infecção, sendo o sistema PLG/PLA um importante mecanismo de patogênese para esta bactéria (VIEIRA; NASCIMENTO, 2015). A conversão do PLG ligado à *L. interrogans* em plasmina, bem como sua atividade proteolítica, foi descrita pela primeira vez pelo nosso grupo de pesquisa (VIEIRA et al., 2009).

Pelos resultados obtidos (fig. 22) pode-se concluir que o plasminogênio ligado às duas proteínas recombinantes é passível de ser convertido a plasmina. Portanto, pode ser que estas proteínas tenham um papel na patogênese e na invasão dos tecidos pela bactéria.

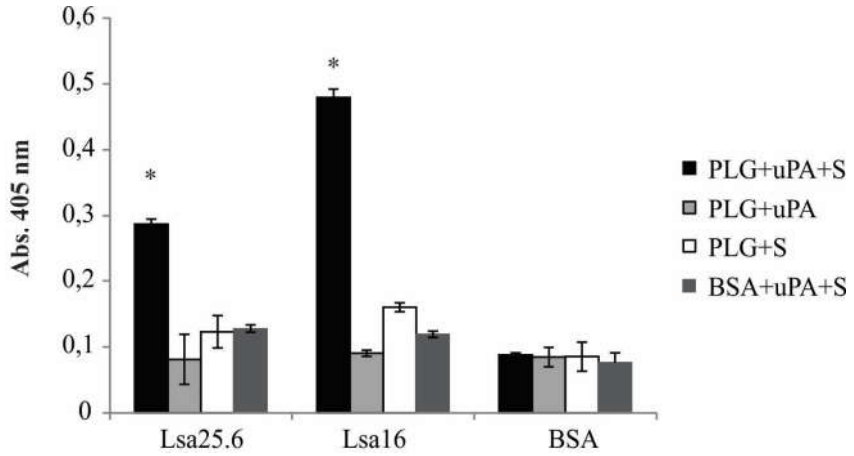


Figura 22 - Geração de plasmina pela ativação do plasminogênio ligado às proteínas recombinantes. A geração de plasmina pelo plasminogênio ligado às proteínas recombinantes foi avaliada por ELISA; As proteínas imobilizadas (1µg/poço) receberam os seguintes tratamentos: plasminogênio+uPA+Substrato específico, ou controles nos quais um dos componentes foi omitido. BSA foi empregado como controle negativo. As barras representam o valor médio de absorbância no comprimento de onda de 405 nm, como uma medida da clivagem do substrato, ± o desvio padrão de três replicatas e são representativas de dois experimentos independentes. A significância estatística é dada em relação ao BSA, por teste t-Student (*p<0,001).

4.10.6 Proteínas recombinates recrutam plasminogênio a partir do soro humano

Foi apresentada anteriormente, a habilidade das proteínas recombinantes em questão interagirem com os componentes purificados. Entretanto, avaliamos também a capacidade de cada proteína recombinante captar o plasminogênio do soro humano comercial (*Sigma-Aldrich*), por ELISA, pois já foi descrito que somente cepas virulentas podem recrutar o PLG diretamente do soro humano (VIEIRA et al., 2009). As proteínas recombinantes foram imobilizadas em placas e incubadas com diferentes concentrações de soro humano saudável comercial. A ligação foi detectada usando anticorpo específico anti-PLG e *anti-mouse* conjugado com peroxidase.

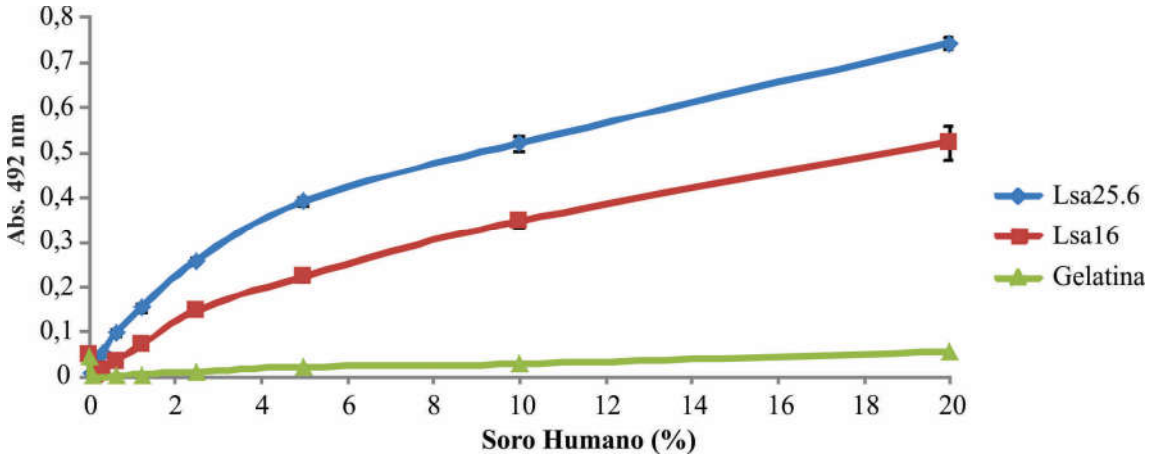


Figura 23 - As proteínas recombinantes recrutam PLG de forma dose-dependente. Um micrograma de proteína recombinante foi imobilizado, em placa de ELISA, e incubado com diferentes concentrações (0-20%) de soro humano saudável comercial (Sigma). Gelatina foi usada como controle negativo de ligação. A ligação foi detectada com antissoro policlonal anti-PLG (1:5000) e, depois de lavagens, com antissoro anti-*mouse* (1:5000) conjugado com peroxidase. Cada ponto representa a média de absorbância de uma triplicata à 492 nm ± desvio padrão, e é representativo de dois experimentos independentes.

Como apresentado na figura 23, as duas proteínas recombinantes apresentaram um perfil dose-dependente e não apresentam saturação nas concentrações testadas. Dessa forma, as duas proteínas recombinantes são capazes de recrutar o PLG do soro humano, sendo a Lsa25.6 mais eficiente na ligação, entretanto, quando se trata do PLG purificado, a Lsa16 apresenta maior eficiência na ligação.

4.10.7 Inibição do coágulo de fibrina pelas proteínas recombinantes

Uma das manifestações mais graves da leptospirose inclui um sério quadro hemorrágico (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010), e um dos possíveis mecanismos para a explicação do aparecimento destes sintomas é que as leptospiras se ligariam ao fibrinogênio, dificultando ou impedindo a formação do coágulo de fibrina. De fato, as leptospiras se ligam ao fibrinogênio (CHOY et al., 2007; PINNE; CHOY; HAAKE, 2010) e algumas proteínas de superfície exercem uma diminuição na formação do coágulo de fibrina (LIN et al., 2011). Foi demonstrado pela primeira vez pelo nosso grupo, que as leptospiras quando ligadas ao fibrinogênio, impedem a formação do coágulo de fibrina (OLIVEIRA et al., 2013).

Foi verificado o efeito da ligação das proteínas recombinantes ao fibrinogênio em relação à formação do coágulo de fibrina. Conforme apresentado na figura 24, a proteína Lsa25.6 ligada ao fibrinogênio é capaz de reduzir a formação do coágulo de fibrina, apresentando uma redução significativa quando se compara a porcentagem do coágulo na região de saturação. Já a proteína Lsa16 não mostrou qualquer efeito na formação do coágulo de fibrina.

Assim, esta proteína pode contribuir no quadro hemorrágico apresentado durante as manifestações severas da leptospirose.

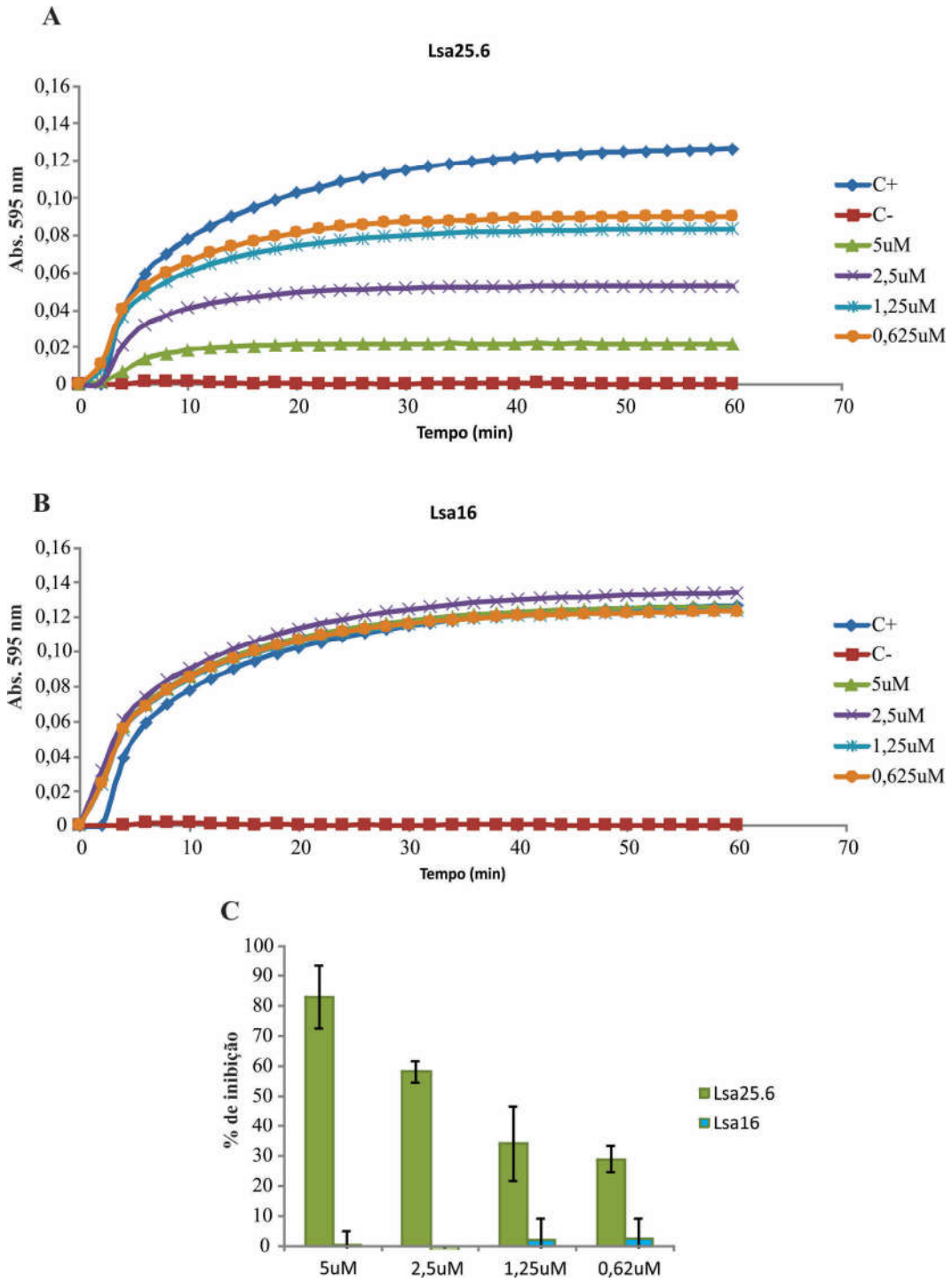


Figura 24 - Inibição do coágulo de fibrina pelas proteínas recombinantes. (A) Lsa25.6 **(B)** Lsa16. Fibrinogênio (1 mg/mL) foi incubado com a diferentes concentrações de proteína recombinante (5, 2,5; 1,25 e 0,62 µM) por 2 h, a 37 ºC, e então foram adicionados 90 uL dessa solução a cada poço de uma placa de ELISA, mais 10 µL de trombina (2 U/mL). O controle positivo se refere ao fibrinogênio mais trombina, e no controle negativo esta última foi omitida. (C) Comparação entre as porcentagens do coágulo em função da concentração das proteínas recombinantes foi feita pelo teste t-Student (***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05).

4.10.8 Avaliação dos epítopos imunogênicos e da conformação estrutural das proteínas recombinantes na ligação com os diferentes componentes

Foi realizado este ensaio para avaliar se os sítios de interação da proteína recombinante com os componentes que elas interagem são os mesmo sítios de ligação do antissoro policlonal (epítopos), os quais foram produzidos em camundongos BALB/c imunizados com a própria proteína recombinante. Além disso, foi avaliada a contribuição da estrutura da proteína para a ligação ao componente, ou seja, determinar se o sitio de ligação ao componente é estrutural ou linear. Para isso, a proteína com 100% de ligação ao componente foi empregada com controle positivo da reação. Foi observado para a Lsa25.6 aproximadamente 90% de redução da ligação à laminina ocorre a presença do antissoro policlonal, sugerindo que os epítopos imunogênicos são os mesmos relacionados a adesão da recombinante à laminina. Com relação ao plasminogênio, observa-se uma redução de aproximadamente 70% da interação da recombinante ao PLG quando incubado previamente com antissoro policlonal. Para o fibrinogênio, a incubação com antissoro reduziu 80% a ligação ao componente. A Lsa25.6 desnaturada reduziu a ligação com todos os componentes, sugerindo que os sítios de ligação aos componentes são estruturais e dependem da conformação para a interação com o componente.

Já, esta análise, para a Lsa16, observou-se que houve redução da ligação com a presença do antissoro para os componentes laminina e plasminogênio. Para o componente fibrinogênio, não houve alteração de ligação com a prévia incubação com antissoro. A desnaturação da recombinante reduziu a interação com todos os componentes, demonstrando que se trata de sítios estruturais de ligação a esses componentes.

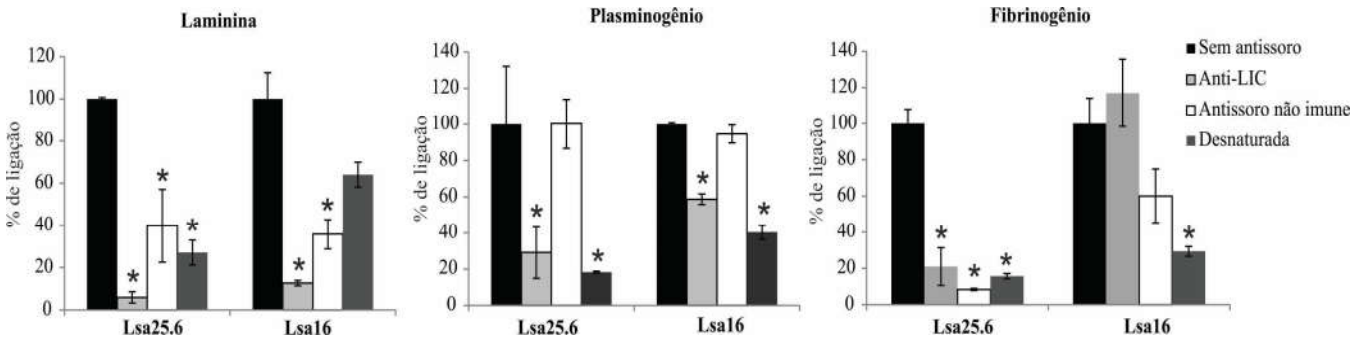


Figura 25 - Avaliação dos epítopos imunogênicos e da conformação estrutural das proteínas recombinantes na ligação com os diferentes componentes. (A) Em placa de ELISA foram imobilizados 1 µg de laminina por poço. Então foram adicionados 1 µg de proteína recombinante, previamente incubado com o antissoro (anti-recombinante), ou (antissoro não imune) ou sem adição de anticorpo (sem antissoro), em seus respectivos poços. Após a incubação, o antissoro foi sondado utilizando o anticorpo anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase. O mesmo foi realizado em **(B)** utilizando o componente plasminogênio e em **(C)** utilizando o componente fibrinogênio. Para os cálculos estatísticos a ligação das proteínas recombinantes aos componentes sem tratamento foi comparado aos pontos em que houve tratamento, pelo teste t-Student (* $p<0,05$).

5 CONCLUSÕES

A análise por bioinformática foi importante para predizer a localização, detectar o peptídeo sinal, a respectiva enzima de clivagem e para a seleção das proteínas deste estudo. Experimentos de localização, como PK e ELISA de bactéria intacta, foram fundamentais para corroborarem com os resultados *in silico*. Dessa forma, selecionar proteínas de membrana externa e bem conservadas, é importante, visto que são alvos vacinais promissores por terem a vantagem de induzir uma resposta imune cruzada entre diferentes espécies e sorovares.

As duas sequências codificadoras estudadas, LIC13059 e LIC10879, foram encontradas em diferentes espécies de *Leptospira* spp*.,* principalmente nas espécies patogênicas, como mostram o filograma e o *Western Blotting* dos extratos de diferentes espécies. Os genes foram clonados, e suas respectivas proteínas recombinantes expressas em *E. coli* BL21(DE3)Star pLysS na forma de corpúsculos de inclusão.

Após estudos de estrutura, as proteínas recombinantes foram capazes de promover resposta imune humoral em modelo animal. Além disso, mostraram-se capazes de interagir, de forma dose-dependente, com componentes na matriz extracelular, do plasma e receptor celular do hospedeiro, como a laminina, o plasminogênio, o fibrinogênio e a e-caderina. Pelo ensaio de bloqueio com antissoro da ligação ao componente, sugere que alguns epitopos estão localizados ao lado ou dentro dos domínios de interação. Além disso, foi demonstrado que são sítios estruturais de ligação a esses componentes.

Esses resultados indicam que as proteínas Lsa25.6 e Lsa16 podem estar envolvidas no processo de colonização e invasão do hospedeiro pela *Leptospira*, além disso, sugere-se que elas sejam expressas durante a infecção. De forma inédita, foi caracterizada a proteína recombinante, Lsa16, capaz de interagir com a e-caderina, um receptor de superfície responsável pela junções célula-célula do hospedeiro, sugerindo envolvimento dessa proteína no contato inicial da bactéria com o hospedeiro. A interação da proteína Lsa25.6 com o fibrinogênio e a subsequente inibição do coágulo de fibrina pode sugerir o envolvimento dessa proteína em manifestações hemorrágicas em pacientes com leptospirose. Já a Lsa16, que tem alta afinidade pelo plasminogênio purificado, porém uma afinidade menor do que a outra proteína recombinante quando o PLG é captado do soro humano. Dessa forma, mostraram-se capazes de ligar esse componente e ajudar a *Leptospira* a se tornar um organismo proteolítico, evadindo o sistema imunológico e atingindo sítios secundários de colonização, por meio do sistema PLG/PLA.

REFERÊNCIAS*

ADLER, B. History of leptospirosis and leptospira. **Curr Top Microbiol Immunol,** v. 387, p. 1-9, 2015.

ADLER, B.; CHAPPEL, R. J.; FAINE, S. The sensitivities of different immunoassays for detecting leptospiral antigen. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A,** v. 252, n. 3, p. 405-413, 1982.

ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol,** v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.

AGAMPODI, S. B. et al. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. **Clin Infect Dis,** v. 54, n. 9, p. 1249-1255, 2012.

AHMED, S. A. et al. Rapid diagnosis of leptospirosis by multiplex PCR. **Malays J Med Sci,** v. 19, n. 3, p. 9-16, 2012.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res,** v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ARMONY, G. et al. Cross-linking reveals laminin coiled-coil architecture. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 113, n. 47, p. 13384-13389, 2016.

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.

BAJANI, M. D. et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. **J Clin Microbiol,** v. 41, n. 2, p. 803-809, 2003.

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.

BEARD, C. W.; MASON, P. W. Out on the farm with DNA vaccines. **Nat Biotechnol,** v. 16, n. 13, p. 1325-1328, 1998.

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.

---

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

BLANCO, R. M. et al. Is the microagglutination test (MAT) good for predicting the infecting serogroup for leptospirosis in Brazil? **Comp Immunol Microbiol Infect Dis,** v. 44, p. 34-36, 2016.

BRANGER, C. et al. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic Leptospira based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. **FEMS Microbiol Lett,** v. 243, n. 2, p. 437-445, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia Leptospirose: Diagnóstico e Manejo Clínico Brasilia, D. F.: Ministério da Saúde, 2009. 32 p.

CARVALHO, E. et al. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. **FEBS Lett**, 2009a.

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

CHASSIN, C. et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, Leptospira interrogans. **J Immunol,** v. 183, n. 4, p. 2669-2677, 2009.

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

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

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 Dised. 2015.

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

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.

DA CUNHA, C. E. et al. Infection with Leptospira kirschneri Serovar Mozdok: First Report from the Southern Hemisphere. **Am J Trop Med Hyg,** v. 94, n. 3, p. 519-521, 2016.

DOMINGOS, R. et al. The novel Leptospira interrogans protein Lsa32 is expressed during infection and binds laminin and plasminogen. **Microbiology**, 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.

DUPOUEY, J. et al. Human leptospirosis: an emerging risk in Europe? **Comp Immunol Microbiol Infect Dis,** v. 37, n. 2, p. 77-83, 2013.

EDWARDS, C. N.; LEVETT, P. N. Prevention and treatment of leptospirosis. **Expert Rev Anti Infect Ther,** v. 2, n. 2, p. 293-298, 2004.

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

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

FAINE, S. et al., Leptospira and Leptospirosis. 2. ed. Melbourne, Australia: MediSci, 1999. v. 2, p. 272.

FAISAL, S. M. et al. Evaluation of protective immunity of Leptospira immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine,** v. 26, n. 2, p. 277-287, 2008.

FELZEMBURGH, R. D. et al. Prospective study of leptospirosis transmission in an urban slum community: role of poor environment in repeated exposures to the Leptospira agent. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 8, n. 5, p. e2927, 2014.

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

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

FIGUEREDO, J.M. et al. Characterization of two new putative adhesins of Leptospira interrogans. **Microbiology**, 2016. (em submissão)

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

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 Bioanal Chem,** v. 384, n. 1, p. 57-64, 2006.

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

GORIS, M. G.; HARTSKEERL, R. A. Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. **Curr Protoc Microbiol,** v. 32, p. Unit 12E.15., 2014.

GORIS, M. G. et al. Towards the burden of human leptospirosis: duration of acute illness and occurrence of post-leptospirosis symptoms of patients in the Netherlands. **PLoS One,** v. 8, n. 10, p. e76549, 2013.

_____. Potent innate immune response to pathogenic leptospira in human whole blood. **PLoS One,** v. 6, n. 3, p. e18279, 2011.

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

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

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

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

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

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

HAUK, P. et al. Expression and characterization of HlyX hemolysin from Leptospira interrogans serovar Copenhageni: potentiation of hemolytic activity by LipL32. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 333, n. 4, p. 1341-1347, 2005.

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

HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K. In vitro susceptibilities of seven Leptospira species to traditional and newer antibiotics. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 47, n. 8, p. 2646-2648, 2003.

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

JORRITSMA, S. H. et al. Delivery methods to increase cellular uptake and immunogenicity of DNA vaccines. **Vaccine,** v. 34, n. 46, p. 5488-5494, 2016.

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

KALIL, J.; CUNHA-NETO, E.; GUILHERME, L. **Novas estratégias de vacinas**. Gazeta Médica da Bahia, p.65-71. 2008.

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

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

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

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

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.

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

LAU, C. L. et al. Emergence of new leptospiral serovars in American Samoa - ascertainment or ecological change? **BMC Infect Dis,** v. 12, p. 19, 2012.

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

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

LI, L.; SAADE, F.; PETROVSKY, N. The future of human DNA vaccines. **J Biotechnol,** v. 162, n. 2-3, p. 171-182, 2012.

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

LIN, Y. P. et al. Repeated domains of leptospira immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. **J Biol Chem,** v. 284, n. 29, p. 19380-19391, 2009.

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

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

MACIEL, E. A. et al. Household transmission of leptospira infection in urban slum communities. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 2, n. 1, p. e154, 2008.

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 Publica,** v. 15, n. 4, p. 249-255, 2004.

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

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

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

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

MONARIS, D. et al. Protective Immunity and Reduced Renal Colonization Induced by Vaccines Containing Recombinant Leptospira interrogans Outer Membrane Proteins and Flagellin Adjuvant. **Clin Vaccine Immunol,** v. 22, n. 8, p. 965-973, 2015.

MOREY, R. E. et al. Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. **J Clin Microbiol,** v. 44, n. 10, p. 3510-3516, 2006.

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.

NAHORI, M. A. et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. **J Immunol,** v. 175, n. 9, p. 6022-6031, 2005.

NAIMAN, B. M. et al. Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. **Infect Immun,** v. 70, n. 11, p. 6147-6157, 2002.

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.

_____. Computational prediction of subcellular localization. **Methods Mol Biol,** v. 390, p. 429-466, 2007.

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

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

NEVES, F. O. et al. Identification of a novel potential antigen for early-phase serodiagnosis of leptospirosis. **Arch Microbiol,** v. 188, n. 5, p. 523-532, 2007.

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

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

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

_____. Intermediate and C-terminal regions of leptospiral adhesin Lsa66 are responsible for binding with plasminogen and extracellular matrix components. **J. Med. Microbiol.**, v. 63, n. 9, p. 1119-1130, 2014.

OLIVEIRA, T. R. et al. Evaluation of leptospiral recombinant antigens MPL17 and MPL21 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays. **Clin Vaccine Immunol,** v. 15, n. 11, p. 1715-1722, 2008.

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

PANAPHUT, T.; DOMRONGKITCHAIPORN, S.; THINKAMROP, B. Prognostic factors of death in leptospirosis: a prospective cohort study in Khon Kaen, Thailand. **Int J Infect Dis,** v. 6, n. 1, p. 52-59, 2002.

PANAPHUT, T. et al. Ceftriaxone compared with sodium penicillin g for treatment of severe leptospirosis. **Clin Infect Dis,** v. 36, n. 12, p. 1507-1513, 2003.

PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E. Phylogenetic foundation of spirochetes. **J Mol Microbiol Biotechnol,** v. 2, n. 4, p. 341-344, 2000.

PASTER, B. J. et al. Phylogenetic analysis of the spirochetes. **J Bacteriol,** v. 173, n. 19, p. 6101-6109, 1991.

PATRA, K. P. et al. Comparative analysis of lipopolysaccharides of pathogenic and intermediately pathogenic Leptospira species. **BMC Microbiol,** v. 15, p. 244, 2015.

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

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

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

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

_____. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic Leptospira during infection and binds skin and vascular elastin. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 4, n. 9, p. e815, 2010.

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

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

PROMEGA technical manual: pGEM-T and p-GEM-t Easy vector sistem. USA: 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.

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.

RESENDE, R. R. Biotecnologia aplicada à saúde, 1 ed. 3 vol. Bluncher, São Paulo, Brasil: 2015.

RESSNER, R. A. et al. Antimicrobial susceptibilities of geographically diverse clinical human isolates of Leptospira. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 52, n. 8, p. 2750-2754, 2008.

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

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

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.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHALK, J. A. et al. Preclinical and clinical safety studies on DNA vaccines. **Hum Vaccin,** v. 2, n. 2, p. 45-53, 2006.

SCHOONE, G. J. et al. An immunoprotective monoclonal antibody directed against Leptospira interrogans serovar copenhageni. **J Gen Microbiol,** v. 135, n. 1, p. 73-78, 1989.

SCHRODER, N. W. et al. Immune responses induced by spirochetal outer membrane lipoproteins and glycolipids. **Immunobiology,** v. 213, n. 3-4, p. 329-340, 2008.

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.

SCHWARZ-LINEK, U.; HOOK, M.; POTTS, J. R. The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. **Mol Microbiol,** v. 52, n. 3, p. 631-641, 2004.

SETUBAL, J. C. et al. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. **Microbiology,** v. 152, n. Pt 1, p. 113-121, 2006.

SIGNORINI, M. L. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose human leptospirosis: a meta-analysis of the published literature. **Epidemiol Infect,** v. 141, n. 1, p. 22-32, 2013.

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**, 2013.

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

SOUZA, N. M. et al. Lsa30, a novel adhesin of Leptospira interrogans binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. **Microb Pathog**, 2012.

STRITOF MAJETIC, Z. et al. Epizootiological survey of small mammals as Leptospira spp. reservoirs in Eastern Croatia. **Acta Trop,** v. 131, p. 111-116, 2014.

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

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. 25, 2015.

TOMA, C. et al. Characteristic features of intracellular pathogenic Leptospira in infected murine macrophages. **Cell Microbiol,** v. 13, n. 11, p. 1783-1792, 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. II. Serology. **Trans R Soc Trop Med Hyg,** v. 62, n. 6, p. 880-899, 1968.

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

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; BRAUN, R. P.; BABIUK, L. A. Veterinary DNA vaccines. **Methods Mol Med,** v. 29, p. 79-94, 2000.

VIEIRA, M. L. et al. Interaction of Leptospira interrogans with human proteolytic systems enhances dissemination through endothelial cells and protease levels. **Infect Immun,** v. 81, n. 5, p. 1764-1774, 2013.

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

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

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

_____. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. **FEMS Microbiol Lett**, 2014.

VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. Interaction of spirochetes with the host fibrinolytic system and potential roles in pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, 2015.

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

VIJAYACHARI, P. et al. Immunogenicity of a novel enhanced consensus DNA vaccine encoding the leptospiral protein LipL45. **Hum Vaccin Immunother,** v. 11, n. 8, p. 1945-1953, 2015.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis,** v. 14, n. 5, p. 527-538, 2001.

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

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.

WINSLOW, W. E. et al. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. **J Clin Microbiol,** v. 35, n. 8, p. 1938-1942, 1997.

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

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

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

ZHANG, X. Y. et al. Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospires. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),** v. 37, n. 10, p. 649-656, 2005.