LUCAS PEREIRA E SILVA

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROVÁVEIS PROTEÍNAS DE MEMBRANA IDENTIFICADAS NO GENOMA DE *Leptospira interrogans*

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

LUCAS PEREIRA E SILVA

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROVÁVEIS PROTEÍNAS DE MEMBRANA IDENTIFICADAS NO GENOMA DE *Leptospira interrogans*

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 Nascimento

Versão original

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

© reprodução total

Silva, Lucas Pereira e.
Clonagem, expressão e caracterização de prováveis proteínas de membrana identificadas no genoma de *Leptospira interrogans* / Lucas Pereira e Silva. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Ana Lúcia Tabet Oller Nascimento.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Gênomica funcional.

Versão do título para o inglês: Cloning, expression and characterization of probable membrane proteins identified on *Leptospira interrogans* genome.

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

ICB/SBIB028/2016

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

---

Candidato(a): Lucas Pereira e Silva.

Título da Dissertação: Clonagem, expressão e caracterização de prováveis proteínas de membrana identificadas no genoma de *Leptospira interrogans.*

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

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

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

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

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

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

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 "Clonagem, expressão e caracterização de proteínas de membrana identificadas no genoma de *Leptospira interrogans*", **protocolo nº 1193/14**, sob a responsabilidade de Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento e Lucas Pereira e Silva - 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 23/4/2014.

This is to certify that the proposal "Cloning, expression and characterization of surface-exposed proteins identified in *Leptospira interrogans* genome", **protocol nº 1193/14**, under the responsibility of Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento and Lucas Pereira e Silva, - 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 2/19/2014. 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: 04/2014 - 02/2016	**Nº de animais/espécie**
Centro de Biotecnologia	125 camundongos Balb/c 18-21g (F)

São Paulo, 25 de abril de 2014

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Aos meus pais, irmã, tios, prima e amigos que sempre me apoiaram em todas as fases da minha vida,

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ana Lucia Tabet Oller Nascimento, pela orientação e recepção de braços abertos em seu laboratório, pela dedicação, paciênciae incentivo na realização do meu trabalho.

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

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

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

Ao Dr. Henrique Rofatto, do Laboratório de parasitologia do Instituto Butantan, pelo total apoio na análise das lâminas de Leptospira no ensaio de Imunofluorescênsia.

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

Aos meus co-orientadores D.ra Mônica Vieira, e M.e Luis Guilherme Fernandes, que me ajudaram a realizar o trabalho da melhor forma possível, sempre procurando me ajudar a solucionar os problemas com muita paciência e dedicação.

Aos meus pais, Osvaldo Cesar e Sandra e irmã Ludmila pelo carinho e dedicação que sempre tiveram por mim, apoiando todas as minhas decisões.

Aos meus tios Edmilson e Helbe e minhas primas Gabriela e Giulia pelo carinho e dedicação.

Ao meu sobrinho Bento, que ainda irá nascer.

Aos meus amigos, Diego, Luiz Fernando, Fernando, Merícia, Osni, Heloisa, Giovana, Renan e Mauro pelo apoio e incentivo.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo, bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Ciêntifico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Butantan.

Agradeço a todos!

“Há uma teoria que indica que sempre que qualquer um descobrir exatamente o que, para que e porque o universo está aqui, o mesmo desaparecerá e será substituído imediatamente por algo ainda mais bizarro e inexplicável... Há outra teoria que indica que isto já aconteceu”

Douglas Adams

RESUMO

SILVA, L. P. **Clonagem, expressão e caracterização de prováveis proteínas de membrana identificadas no genoma de *Leptospira* interrogans.** 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A leptospirose é uma zoonose bastante disseminada, causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. A doença apresenta um amplo quadro de manifestações clínicas em humanos, variando desde febre, calafrios, dor de cabeça e muscular, até uma condição mais severa, conhecida como síndrome de Weil, caracterizada por hemorragia, falência renal e icterícia. No Brasil e outros países da América Latina, a doença tem se tornado um grave problema de saúde pública, sendo associada ao rápido crescimento populacional, ao aumento de favelas, às enchentes e à falta de saneamento básico. Estas condições favorecem a proliferação de roedores, principais vetores de transmissão da leptospirose. O sequenciamento do genoma completo da*L. interrogans* sorovar Copenhageni, a obtenção e caracterização de proteínas potencialmente envolvidas na patogênese desta bactéria, como lipoproteínas e proteínas de membrana externa, por técnicas de DNA recombinante, podem fornecer dados importantes sobre a interação patógeno-hospedeiro. Desta forma, foram selecionados dois genes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, LIC10821 e LIC10064, tendo como critério a predição de localização das proteínas na membrana. A sequencia codificadora LIC10821 mostrou-se a mais frequente em diferentes espécies patogênica de *Leptospira* e ausente na espécie saprofítica. Os fragmentos referentes aos genes foram clonados no vetor pGEM-T Easy e subclonados no vetor de expressão pAE, que acrescenta a sequência de 6 resíduos de histidina na extremidade N-terminal das proteínas recombinantes. As proteínas recombinantes foram expressas em *E.coli.* A proteína rLIC10821 foi expressa em forma de corpúsculos de inclusão esolubilizada com ureia; já a proteína rLIC10064 foi obtida na forma solúvel. Após purificação e diálise, foi verificado por dicroísmo circular que as proteínas recombinantes apresentavam estrutura secundaria. As proteínas recombinantes promoveram resposta humoral e ausência de resposta celular emcamundongos BALB/c imunizados. Resultados de imunofluorescência, proteólise por proteinase K e ELISA de bactéria intacta, sugerem que os dois genes codificam para proteínas localizadas na membrana externa da bactéria. A proteína recombinante rLIC10821 foi reconhecida por soros de pacientes diagnosticados com leptospirose. Em ensaios de adesão, a proteína rLIC10821 foi capaz de se ligar ao plasminogênio, sendo esta interação dose-dependentes e saturável. A proteína rLIC10821 também mostrou ligação dose-dependente à laminina e ao fibrinogênio. A interação com o fibrinogênio é capaz de reduzir a formação do coágulo de fibrina. Já a proteína rLIC10064 não apresentou ligação com nenhum dos componentes do hospedeiro testados. Estes resultados sugerem que a proteína rLIC10821 por estar exposta e interagir com componentes do hospedeiro pode estar envolvida no processo de patogênese da bactéria.A interação da proteína rLIC10821 com o fibrinogênio, diminuindo a formação do coágulo de fibrina, pode sugerir o envolvimento desta proteína no quadro hemorrágico presente na leptospirose severa.

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

ABSTRACT

SILVA, L. P. **Cloning, expression and characterization of probable membrane proteins identified on the *Leptospira interrogans* genome.** 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Leptospirosis is a highly disseminated zoonosis, caused by pathogenic bacteria of genus *Leptospira*. The disease presents a broad spectrum of clinical manifestations in humans, ranging from fever, chills, muscular pain and headaches, to a more severe condition, known as Weil syndrome, characterized by hemorrhage, renal failure and jaundice. In Brazil and other countries in Latin America, the disease has become an important public health problem, due to the rapid growth of population, increase of slums, flooding events and the lack of sanitary measures. These conditions favor the proliferation of rodents, the main reservoir of leptospires. The annotation of the genome sequences of *L. interrogans* serovar Copenhageni, the identification and characterization of proteins, potentially involved in pathogenesis of the bacteria, such as lipoproteins and outer-membrane proteins, by recombinant DNA techniques, can provide important data about the pathogen-host interactions. Thus, two coding sequences of*L. interrogans* serovar Copenhageni, LIC10821 and LIC10064, were selected based on their predicted cellular location. The LIC10821 gene was moreconserved than LIC10064 among different species and serovars of pathogenic *Leptospira*. The corresponding DNA fragment of the genes was cloned into pGEM-T Easy vector and subcloned in expression vector pAE, which adds a tag of six histidine residues at the N-terminus of the recombinant proteins. The recombinant protein rLIC10821 was expressed in *E. coli* as inclusion bodies, and solubilizedwith urea. The protein rLIC10064 was expressed in its soluble form. After purification and dialysis, the recombinant proteins presented secondary structure contents, as evaluated by circular dichroism assay. The recombinant proteins elicited mainly humoral response in immunized BALB/c mice. Immunofluorescence,experiment with intact bacteria and proteinase K proteolysis data suggest that the two genes encode for proteins located at thesurface of *Leptospira*. The recombinant protein rLIC10821 was recognized by positive leptospirosis human serum samples. Binding assays were performed, and the rLIC10821 protein was able to interact with plasminogen, being this interaction dose-dependent and saturable. rLIC10821 also binds to fibrinogen and laminin in a dose-dependent manner. The protein rLIC10064 was not capable of binding to any of the tested human components. The results suggest that the corresponding rLIC10821 in *Leptospira*, due to its location and the capacity to interact with human host components, may be involved in the pathogenesis process. Additionally, rLIC10821 binds to fibrinogen, reducing fibrin clot formation, and might be involved in the hemorrhagic process observed in severe leptospirosis.

Keywords: *Leptospira.* Leptospirosis. Recombinant proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura e composição da membrana de *Leptospira spp*.....18

Figura 2 -Vetor de clonagem pGEM-T Easy.....30

Figura 3 - Vetor de expressão pAE.....31

Figura 4 - Filogramas obtidos no software clustal omega pelo alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de diversas espécies e sorovares de *Leptospira*.....44

Figura 5 -Análise dos fragmentos de DNA obtidos por amplificação em reação de PCR; análise dos fragmentos de DNA após digestão do plasmídeo pAE-LIC em gel de agarose.....46

Figura 6 - Análise da expressão das proteínas recombinantes em diferentes cepas de *E. coli* em gel SDS PAGE 12%.....47

Figura 7 -Detecção das proteínas recombinantes por *Western Blotting* utilizando o anticorpo monoclonal anti-his.....48

Figura 8 - Análise do processo de purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade ao metal.....49

Figura 9 -Espectroscopia Circular (CD).....50

Figura 10 - Resultados obtidos na titulação dos soros de camundongos BALB/c imunizados com as proteínas rLIC10821 rLIC10064.....51

Figura 11 - Detecção das proteínas recombinantes por *Western Blotting* utilizando o anticorpo policlonal anti-rLIC.....51

Figura 12 - Ensaio de acessibilidade das proteínas recombinantes por Proteinase K (PK).....53

Figura 13 - Avaliação da localização celular das proteínas codificadas pelos genes LIC10821 e LIC10064 em bactéria intacta.....54

Figura 14 -Ensaio de localização celular por imunofluorescência.....55

Figura 15 - Avaliação da reatividade dos pacientes diagnosticados com leptospirose com as proteínas rLIC10821 e rLIC10064.....56

Figura 16 - Análise da presença da proteína rLIC10064 em diferentes espécies e cepas de *Leptospira* spp.por Western Blotting.....57

Figura 17 -Avaliação da adesão das proteínas rLIC10821 e rLIC10064 com os componentes da matriz extracelular utilizando anticorpo policlonal.....59

Figura 18 -Avaliação da adesão da proteína rLIC10821 a Laminina utilizando anticorpo monoclonal anti-his.....59

Figura 19 - Avaliação da interação das proteínas rLIC10821 e rLIC10064 com componentes do plasma empregando o soro policlonal anti-rLIC10821.....60

Figura 20 - Avaliação da interação da proteína rLIC10821 os componentes do plasma utilizando anticorpo monoclonal anti-his.....62

Figura 21 -Avaliação da interferência do antisoro na interação da proteína recombinante com laminina.....62

Figura 22 - Avaliação da interferência do antissoro na interação da proteína recombinante com plasminogênio e fibrinogênio.....62

Figura 23 - Ensaio de dose dependência da reação da rLIC10821 com o plasminogênio.....63

Figura 24 - Ensaio de dose dependência da reação da rLIC10821 com a laminina.....64

Figura 25 - Ensaio de dose dependência da reação da rLIC10821 com o fibrinogênio.....64

Figura 26 - Caracterização da ligação da proteína rLIC10821 com o plasminogênio.....66

Figura 27 -Ensaio de conversão de plasminogênio em plasmina.....67

Figura 28 - Ensaio de Inibição do coágulo de fibrina.....68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes por PCR.....31
Quadro 2 - Linhagens e condições de crescimento de diferentes cepas de *E. coli*.....32
Quadro 3 - Resumo das análises *in silico* dos genes estudados.....43
Quadro 4 - Resultados da análise do espectro obtido por CD pelo software CAPITO.....50
Quadro 5 - Reatividade do soro de pacientes infectados contra as proteínas recombinantes estudadas.....57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2YT/ON	Meio de cultura contendo 1% de extrato de levedura e, 1,6% de peptona.
ACA	Ácido Aminocapróico
Amp	Ampicilina
BSA	Albumina de Soro Bovino
C4bp	C4 *binding protein* (proteína ligante de C4)
CD	Dicroísmo Circular
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
EMJH	Meio de Cultura Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris
FICT	Isoticionato de fluoresceína
His	Histidina
Ig	Imunoglobulina
IP	Iodeto de Propídio
IPTG	Isopropil-β-tiogalactosídeo
Kb	Kilobase
LB	Meio Luria-Bertani contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% detriptona e 1% de NaCl
LPHS	Síndrome pulmonar hemorrágica associada à leptospirose.
MAT	Teste de microaglutinação
OPD	o-fenillenodiamina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
Pb	Pares de Base
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	PBS contendo 0,05% Tween 20
PCR	*Polymerase chain reaction* (reação de cadeia da polimerase)

PK	Proteinase K
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluor
RBS	Sítio de ligação ao ribossomo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
uPA	Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 Microbiologia e biologia celular de *Leptospira* spp. 17
1.2 Classificação e Taxonomia 19
1.3 Gênomica e Biologia Molecular 19
1.4 Leptospirose 20
1.5 Epidemiologia da doença 21
1.6 Diagnóstico e tratamento 22
1.7 Patogênicidade e fatores de virulência 23
1.8 Vacinas e candidatos vacinais 25
2 OBJETIVOS 27
2.1 Objetivos gerais 27
2.2 Objetivos específicos 27
3 MATERIAL E MÉTODOS 28
3.1 Componentes biológicos 28
3.2 Cepas bacterianas 28
3.3 Análises *in silico* das sequências codificadoras LIC10821 e LIC10064 28
3.4 Extração do DNA genômico de *Leptospira interrogans* 29
3.5 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes em *E. coli* 30
3.5 Espectroscopia Circular (CD) 33
3.6 Teste de microaglutinação (MAT) 33
3.7 Produção e titulação dos antissoros policlonais contra rLIC10821 e rLIC10064 34
3.8 Ensaio de acessibilidade por Proteinase K (PK) 35
3.9 Ensaio de detecção das proteínas nativas na bactéria intacta 35
3.10 Ensaio de imunofluorescência 36
3.11 Ensaios de Immunoblotting 37
3.12 Interação das proteínas rLIC10821 e rLIC10064 com componentes da matriz extracelular (ECM) e do plasma 37
3.13 Curvas de dose-dependência 38
3.14 Inibição da interação das proteínas recombinantes com componentes após incubação com antissoro policlonal 39
3.15 Caracterização da ligação da proteína recombinante com o PLG 39
3.16 Ensaio de atividade enzimática da plasmina 40

3.17 Inibição da formação do coágulo de fibrina 40
3.18 Análises estatísticas 41
3.19 Comitê de Ética animal e Humana 41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 42
4.1 Análises *in silico* dos genes selecionados 42
4.2 Análise da presença dos genes nos diversos sorovares de *Leptospira* 43
4.3 Clonagem dos genes selecionados 44
4.4 Expressão das proteínas recombinantes 46
4.5 Purificação e diálise das proteínas recombinantes 48
4.6 Avaliação Imunológica 50
4.7 Avaliação da localização celular 52
4.7.1 Ensaio de acessibilidade por Proteinase K (PK) 52
4.7.2 Ensaio de bactéria intacta 53
4.7.3 Ensaio de imunofluorescência 54
4.8 Reatividade com soro de pacientes 56
4.9 Presença da proteína em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* spp. 57
4.10 Adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular e plasma 58
4.11 Curva de dose resposta 63
4.12 Conversão de plasminogênio a plasmina 66
4.13 Inibição do coágulo de fibrina 67
5 CONCLUSÃO 69
REFERÊNCIAS 71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microbiologia e biologia celular de *Leptospira* spp.

Leptospiras são espiroquetas de aproximadamente 0,1 µm de diâmetro e entre 6-20 µm de comprimento, podendo compreender tanto espécies patogênicas quanto saprofíticas pertencentes ao gênero *Leptospira*, família *Leptospiraceae* e ordem Spirochaetales (FAINE et al., 1999). Essas bactérias são facilmente distinguidas de outras espiroquetas por apresentarem uma característica morfológica peculiar, uma curvatura em suas extremidades que faz a bactéria se assemelhar a um ponto de interrogação (FAINE et al., 1999; LI et al., 2000).

As Leptospiras não são coradas pelo método de Gram. Comumente são coradas por sais de prata ou observadas diretamente em microscopia ótica de campo escuro, ou contraste de fase (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Possuem crescimento lento tanto em meio de cultura sólido quanto líquido. O crescimento ótimo dessas bactérias é observado em temperaturas entre 28 ºC e 30 ºC em meio suplementado com ácidos graxos de cadeia longa, vitamina B1 e B12 e sais de amônio (FAINE et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Os ácidos graxos são utilizados como fonte de carbono e energia, degradados por meio de β-oxidação. O meio de cultura comumente utilizado no cultivo de leptospiras é o meio Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris (EMJH), que contem ácido oleico, albumina sérica e polisorbato (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Uma característica das Leptospiras é compartilhar características tanto de bactérias Gram-negativas, quanto Gram-positivas. Possui uma membrana dupla e presença de lipopolissacarídeos (JACKSON et al.), presente nas bactérias Gram-negativas, ao passo que a forte associação da membrana plasmática com a parede celular composta de peptídeoglicanos é uma característica semelhante à de bactérias Gram-positivas (FAINE et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009) (Figura 1). O LPS presente na membrana é um grande diferencial das leptospiras em relação as outras espiroquetas como *Treponema pallidum*, *T. denticola* e *Borrelia burgdorferi* (BOON HINCKLEY et al., 2005; HAAKE; MATSUNAGA, 2010).

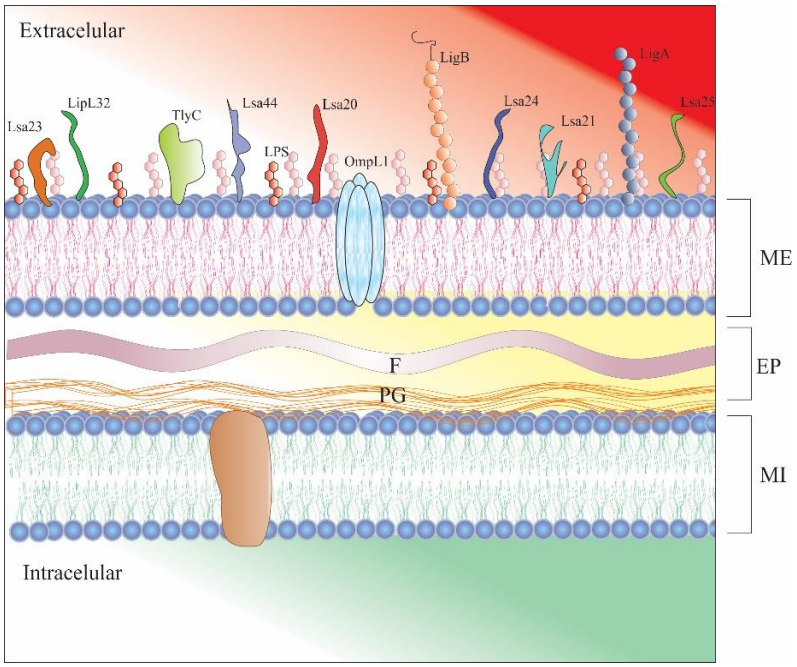

Figura 1. Estrutura e composição da membrana de *Leptospira spp.* A membrana das leptospiras são compostas pela membrana citoplasmática (MI, membrana interna), espaço periplasmático (EP), onde se localizam os flagelos periplasmáticos, e pela membrana externa (ME), composta pelas proteínas expostas e pelos lipopolissacarídeos. As leptospiras possuem características tanto de bactérias Gram-positivas, forte associação da camada de peptideoglicano com a MI, quanto de Gram-negativas, presença de LPS na membrana externa.
Fonte: Fernandes *et al*., 2015

O LPS das leptospiras possui estrutura e resposta imune similar ao LPS de outras bactérias Gram-negativas. Porém, é cerca de 12 vezes menos tóxico do que o de *E. coli* (FAINE et al., 1999).

São bactérias extremamente móveis, contendo dois flagelos periplasmáticos que partem das extremidades da célula e terminam no centro (BHARTI et al., 2003; CHARON; GOLDSTEIN, 2002; LIAO et al., 2009). Apesar de ser uma característica presente tanto em bactérias patogênicas quanto em bactérias saprofíticas, a motilidade pode ser considerada um fator de virulência, visto que bactérias recém isoladas possuem uma maior mobilidade quando comparadas com bactérias mantidas em condições *in vitro* (ELLIS et al., 1983). Esta maior mobilidade indica uma facilidade de deslocamento em meios semelhantes aos tecidos conjuntivos (LI et al., 2000).

1.2 Classificação e Taxonomia

As Leptospiras possuem duas classificações distintas. A sorológica, baseada na resposta imune heterogênea para os diversos LPS presentes na membrana da bactéria (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010), pela qual as Leptospiras são agrupadas em 24 sorogrupos e 250 sorovares de acordo com o teste de microaglutinação (MAT) (LEVETT, 2001; PLANK; DEAN, 2000).

A classificação genética, indica a existência de 19 espécies, sendo 13 patogênicas e 6 saprofíticas. Esta classificação foi feita por hibridização de DNA. As principais espécies causadoras da leptospirose são: *L. interrogans, L. borgpetersenii, L. santarosai, L. noguchi, L. weilii, L. kirschneri e L. alexanderi* (AHMED et al., 2006). Aproximadamente metade dos sorovares patogênicos são classificados em *L. interrogans* ou *L. borgpetersenii* (BRENNER et al., 1999).

Análise filogenética de genes de rRNA 16S sugere a diferenciação das leptospiras em 3 grupos distintos, patogênicas, saprofíticas e intermediárias (LEVETT, 2001; PEROLAT et al., 1998). Baseando-se nesta classificação, o grupo das espécies saprofíticas (*L. biflexa, L.wolbachii, L. kmetyi, L. meyeri, L. vanthielii, L. terpstrae, e L. yanagawae*) forma o ramomais afastado filogeneticamente, enquanto o grupo das espécies patogênicas engloba 8espécies *(L. interrogans, L. kirschneri, L.borgpetersenii, L. santarosai, L. noguchii, L. weilii,L. alexanderi, and L. alstonii*). Outro ramo evolucionário é compreendido pelo grupo daschamadas espécies intermediárias (*L. inadai, L.broomii, L. fainei, L. wolffi, L. licerasiae*), oqual contém espécies de patogenicidade pouco estabelecida (BHARTI et al., 2003; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; LEVETT, 2001).

1.3 Gênomica e Biologia Molecular

O sequenciamento de duas espécies patogênicas de *Leptospira* (*L. interrogans* e *L. borgpeterseenii*) e da espécie saprofítica (*L. biflexa*) forneceu um grande avanço no entendimento da biologia básica e do processo de patogênese desta bactéria (BULACH et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2004a; NASCIMENTO et al., 2004b; PICARDEAU et al., 2008; REN et al., 2003).

Comparação dos genes entre os genomas sequenciados revela que existem 2052 genes preditos em comum (PICARDEAU et al., 2008). Os genomas de *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* contêm aproximadamente 3400 e 2800 genes preditos (excluindo-se *transposons* e pseudogenes), dos quais 656 não são encontrados em *L. biflexa*, a qual possui muitos genes que codificam para proteínas de percepção ambiental e de metabolismo.

1.4 Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose globalmente disseminada causada por espécies patogênicas de bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira*, acomete tanto homens quanto animais, principalmente cães, gado, e porcos (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

A infecção de humanos e animais pode ocorrer diretamente com o contato com urina contaminada ou indiretamente, por meio do contato principalmente com água ou solo contaminado. Nos grandes centros urbanos os principais animais carreadores das leptospiras são os roedores, excretando uma grande quantidade de bactérias vivas mesmo meses após a infecção inicial.

Os sintomas da doença podem variar, sendo que na fase inicial da doença, a pessoa infectada apresenta febre, calafrios, dor de cabeça e muscular. Nos casos severos, a doença pode evoluir para a síndrome de Weil, que ocorre em 5-15% dos casos com uma taxa de mortalidade de 5-40%, tendo como característica a falência múltipla de órgãos, icterícia, meningite, hemorragia, disfunção renal, e hepática e colapso cardiovascular (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001).

A síndrome pulmonar hemorrágica associada à leptospirose (LPHS), primeiramente descrita na Coreia e China(PARK et al., 1989), se tornou foco de especial atenção após um grande surto desta forma severa da doença em Nicarágua, no ano de 1995 (TREVEJO et al., 1998). Subsequentemente, a LPHS emergiu como uma das principais causas de febre hemorrágica em países em desenvolvimento (MACIEL et al., 2008; MAROTTO et al., 1999; PANAPHUT; DOMRONGKITCHAIPORN; THINKAMROP, 2002).

Uma das características deste quadro é o sangramento intenso dos pulmões e dano tecidual agudo, indicando que a patogênese desta síndrome pode ser diferente da síndrome de Weil (KO et al., 1999). No entanto, está síndrome pode ser subdiagnosticada em regiões

altamente endêmicas (MCBRIDE et al., 2005; SEGURA et al., 2005). Os sintomas podem ser moderados e pouco específicos, incluindo dor no peito, tosse e dispneia, que aparecem geralmente entre o quarto e sexto dia da doença. Além disso, a severidade da forma respiratória da leptospirose não está associada à presença de icterícia. Os índices de mortalidade de LPHS podem chegar a 30-70%, e a morte se dá em até 72 horas após o aparecimento dos sintomas (NICODEMO et al., 1997; YERSIN et al., 2000).

Os pacientes que desenvolvem LPHS apresentam altas concentrações de DNA de leptospira nos pulmões (SEGURA et al., 2005), embora o número de bactérias intactas seja pequeno (NICODEMO et al., 1997).

A severidade da leptospirose está relacionada à cepa ou sorovar infectante de *Leptospira* envolvidos e para algumas cepas o tamanho do inóculo pode ser impactante,assim como a idade e imunidade do indivíduo infectado (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

1.5 Epidemiologia da doença

Anualmente, são relatados a FUNASA/MS cerca de 3.000 casos, sendo que este número pode ser subestimado, considerando que muitos casos de leptospirose não são relatados aos órgãos de saúde, devido ao difícil diagnóstico ou falta de atendimento.

A doença é endêmica em países tropicais e subtropicais, sendo mais frequente em países em desenvolvimento onde ocorrem sazonalmente surtos epidêmicos principalmente nas regiões urbanas (BHARTI et al., 2003); estes surtos estão ligados às péssimas condições de saneamento básico eà grande incidência de chuvas e enchentes que promovem maior disseminação da doença. Nos países desenvolvidos, a doença está relacionada às atividades ocupacionais (serviços de água e esgoto, agricultura e pecuária, veterinários, entre outros)e recreacionais (SAKATA et al., 1992).

A leptospirose tem sido considerada uma doença infecciosa reemergente, principalmente na Nícaragua, Brasil, Índia, Malásia e outras regiões tropicais e subtropicais (CRUZ; VARGAS; LOPES, 2009; SARKAR et al., 2012).

1.6 Diagnóstico e tratamento

Para sermos capazes de controlar uma doença infecciosa é essencial a presença de um teste diagnóstico funcional, confiável, sensível e barato (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007).

O teste de Microaglutinação (MAT) é o teste padrão para o diagnóstico de leptospirose, sendo sensível ao sorovar ou sorogrupos de *Leptospira* spp.(FAINE et al., 1999). Entretanto, este diagnóstico não é capaz de detectar a doença em sua fase inicial, pois busca a presença de anticorpos contra os LPS de *Leptospira* spp., principalmente do tipo IgG, os quais são gerados em 5-7 dias após a exposição com o patógeno (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007).

Diluições seriadas do soro do paciente são misturadas com suspensões vivas de *Leptospira spp.*, o título do soro é considerado a diluição máxima onde a aglutinação é 50% (LANGSTON; HEUTER, 2003). Apesar de atender algumas das características, como a alta sensibilidade e especificidade (BHARTI et al., 2003; CUMBERLAND; EVERARD; LEVETT, 1999), este teste é demorado, feito em laboratórios de referência e exige pessoas capacitadas para execução e pode variar o resultado de acordo com o laboratório (BHARTI et al., 2003; CHAPPEL et al., 2004; VIJAYACHARI; SEHGAL, 2006).

Este teste não consegue diferenciar os anticorpos gerados por infecção ou vacinação, se tornando um problema no caso de animais, visto que vacinas veterinárias são compostas de uma preparação de leptospiras mortas ou inativadas (NAIMAN et al., 2001; VERNEL-PAUILLAC; MERIEN, 2006; WANG; JIN; WEGRZYN, 2007).

Existem opções para o diagnóstico durante a fase inicial da doença, enquanto não é possível realizar o teste MAT. Durante a fase de leptospiremia, enquanto as leptospiras ainda se encontram na corrente sanguínea, podemos observar as bactérias em amostras clínicas em microscopia ótica de campo escuro, porém trata-se de um método pouco preciso (LEVETT, 2001; TURNER, 1970). Além disso, podem ocorrer interpretações errôneas, visto que as espiroquetas em geral possuem um movimento Browniano muito semelhante a fibrina (FAINE et al., 1999; TURNER; MOHUN, 1970).

Outra alternativa, é o isolamento de bactérias da urina ou do sangue, no caso do sangue as amostras devem ser recolhidas enquanto o paciente estiver na fase de leptospiremia. Neste

procedimento, uma ou duas gotas de sangue são inoculadas em meio semi-sólido contendo 5-fluorouracil, um antibiótico para seleção de leptospiras (JOHNSON; ROGERS, 1964). No entanto, o crescimento das bactérias é muito lento em um isolamento primário (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001), o que dificulta o diagnóstico precoce da doença, onde o tratamento é mais eficaz (TOYOKAWA; OHNISHI; KOIZUMI, 2011).

Existem muitos ensaios objetivando a amplificação de genes do RNAr 16S e 23S(D'ANDREA et al., 2012), bem como genes que codificam proteínas como, OmpL1, Dna girasse, RpOB, proteínas Lig e LipL32 estão sendo desenvolvidos (JOUGLARD et al., 2006; LA SCOLA et al., 2006; LIU et al., 2006; PALANIAPPAN et al., 2006; REITSTETTER, 2006; ROMERO; YASUDA, 2006). Um protocolo de PCR baseado na amplificação do gene da flagelina e do gene *secY* está descrito no Manual da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003).

Depois de diagnosticada a leptospirose, o tratamento envolve a utilização de antibióticos como oxitetraciclina, doxiciclina e penicilina (BABER; STUART, 1946; MCCLAIN et al., 1984). A terapêutica com antibiótico parece reduzir o avanço dos sintomas (a exemplo de duração da hipertermia, tempo de normalização da função renal e tempo de hospitalização) e a ocorrência de sequelas. O antibiótico pode prevenir a ocorrência de infecção sintomática e a evolução para as manifestações mais graves da doença, por isso seu uso é recomendado (MCCLAIN et al., 1984; SEHGAL, 2000; TAKAFUJI et al., 1984; WATT et al., 1988), embora ainda seja um assunto controverso, uma vez que muitos casos de leptospirose severa se resolvem espontaneamente (BHARTI et al., 2003; BRETT-MAJOR; COLDREN, 2012; GRIFFITH; HOSPENTHAL; MURRAY, 2006; KATZ et al., 2001; VINETZ, 2003).

Nos casos graves, nos quais há complicações renais, respiratórias ou hemorrágicas, os pacientes devem ser encaminhados a hospitais que disponham de capacidade para realizar procedimentos como diálise e terapia intensiva (LEVETT, 2001).

1.7 Patogênicidade e fatores de virulência

A disponibilidade das sequências genômicas aliadas as ferramentas genéticas e de bioinformática atuais propiciam boas condições para a pesquisa e consequentemente um melhor entendimento dos mecanismos de patogênese e fatores de virulência das bactérias estudadas.

Os mecanismos moleculares da patogênese ainda são pouco compreendidos, poucos fatores de virulência que contribuem para patogênese da doença foram identificados. Uma série de componentes como o LPS (que já é sabido ser um fator de virulência em diversas bactérias Gram-negativas), hemolisinas, proteínas de membrana externa (OMPs) e moléculas de adesão, que já foram descritas para a interação entre o patógeno e a matriz extracelular pode desempenhar um papel central na colonização do hospedeiro (LJUNGH; MORAN; WADSTRÖM, 1996; PATTI; HÖÖK, 1994).

Muitas cepas de *Leptospira* spp. são capazes de se aderir a componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo I, colágeno tipo IV, laminina e fibronectina. Já foram descritas muitas adesinas localizadas na membrana externa da bactéria, como as proteínas Lsa24, LigA e LigB (BARBOSA et al., 2006; CHOY et al., 2007), proteínas da família Len (STEVENSON et al., 2007), Lsa 21 (ATZINGEN et al., 2008), LipL32 (HOKE et al., 2008), Lp95 (ATZINGEN et al., 2009), TlyC (CARVALHO et al., 2009), Lipl53 (OLIVEIRA et al., 2010), OmpL37 (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010), Lsa63 (VIEIRA et al., 2010), Lsa66 (OLIVEIRA et al., 2011), Lsa20 (MENDES et al., 2011), Lsa33 (DOMINGOS et al., 2012), Lsa30 (SOUZA et al., 2012), Lsa44, Lsa 45 (FERNANDES et al., 2014), Lsa46 e Lsa77 (TEIXEIRA et al., 2015).

Já foi descrito na literatura a capacidade de *Leptospira* spp. se ligar ao plasminogênio com diversos receptores presentes em sua superfície (VIEIRA et al., 2010; VIEIRA et al., 2009). Quando ligado plasminogênio pode ser convertido em plasmina (forma ativa) na superfície da bactéria. É interessante notar que *L. interrogans* virulentas, quando recobertas por plasmina são capazes de degradar fibronectina, componente da matriz extracelular, o que pode contribuir com invasividade das leptospiras (VIEIRA et al., 2009).

Além da maior invasividade, a ligação a plasmina contribui para evasão imune da bactéria, visto que existe uma interferência na deposição de C3b e IgG, diminuindo o processo de opsonização e fagocitose da bactéria (VIEIRA et al., 2011).

Cepas de leptospiras resistentes ao soro foram descritas como sendo capazes de se ligar ao fator H, o qual, quando ligado à superfície das leptospiras, permanece ativo funcionalmente, atuando como co-fator na clivagem de C3b pelo fator I (MERI et al., 2005).

As leptospiras também são capazes de se ligarem ao C4BP (C4 binding protein), que atua como um inibidor da via clássica e das lectinas do complemento. Enquanto ligado a leptospira, o C4BP mantem sua atividade como cofactor, e cliva C4 mediado por Fator I, sugerindo que a

aquisição deste regulador do complemento pode contribuir com a resistência ao soro das leptospiras (BARBOSA et al., 2009). Cepas atenuadas em cultura mantem sua característica de ligação ao fator H e C4bp (CINCO, 2010).

Diversas hemolisinas de *L. interrogans* (Sph1, Sph2, Sph3, HlpA e TylA) são secretadas e possuem atividade hemolítica em eritrócitos de ovelhas, e induzem resposta inflamatória por meio de secreção de IL-1β, IL-6 TNF-α pro macrófagos humanos e de camundongos (WANG et al., 2012).

No genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004a; NASCIMENTO et al., 2004b) foram identificadas possíveis200 proteínas de membrana externa que podem estar relacionadas a patogênese da bactéria. A investigação destas proteínas podem fornecer um maior entendimento da patogênese da bactéria e identificação de fatores de virulência

1.8 Vacinas e candidatos vacinais

A melhor estratégia para combater a leptospirose é a adoção de medidas preventivas, visto que o controle dos roedores é inviável principalmente em grandes centros urbanos, e o saneamento básico nem sempre é possível. O que deixa clara a necessidade do desenvolvimento de uma vacina contra a doença.

Atualmente são utilizadas vacinas obtidas a partir da preparação de leptospiras inativadas por calor ou por formol, porém o uso é principalmente veterinário (BRAMEL; SCHEIDY, 1956; HANSON; TRIPATHY; KILLINGER, 1972; HOAG; BELL, 1955; TEIGLAND, 1956).

Existem vacinas humanas semelhantes às veterinárias, porém são utilizadas em apenas alguns países como Cuba (MARTINEZ et al., 2004), (CHEN, 1985) e França (LAURICHESSE et al., 2007; RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2004).

A imunização com essas vacinas possui diversos efeitos adversos, como dor local, náuseas e febre (FAINE et al., 1997). A resposta imune desta vacina é majoritariamente direcionada aos LPSs, os quais estão presentes em abundância na membrana da bactéria (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001). Deste modo, não fornecem proteção cruzada entre sorovares diferentes, uma vez que são os LPSs que definem os determinantes antigênicos de cada

sorovar (BHARTI et al., 2003; HAAKE, 2000). Em adição não induzem memória, necessitando revacinação, visto que a resposta imune contra os LPSs não são T dependentes.

Um experimento utilizando a lipoproteína exposta LipL41 e uma porina transmembrana OmpL1 foi reportado por Haake, 1999. As proteínas recombinantes foram utilizadas com frações de membrana de *E. coli* na imunização de hamsters. Foi relatada uma sobrevivência de 71% do animais, sugerindo um efeito sinérgico (HAAKE et al., 1999).

Em outros patógenos como *Neisseria meningitidis*, sorogrupo B (PIZZA et al., 2000) e *Streptococcus pneumoniae* (WIZEMANN et al., 2001) a estratégia de utilizar os dados obtidos a partir do sequenciamento do genoma das respectivas bactérias foram bem-sucedidas. Com base nisso, foi feito o sequenciamento da espiroqueta *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004a; NASCIMENTO et al., 2004b) e mais de 200 proteínas foram identificadas, entre elas 170 novas lipoproteínas.

As proteínas de superfície são o primeiro contato do hospedeiro com o patógeno, e portanto são alvos potenciais para induzir a resposta imune. Estas proteínas também podem mediar o processo de adesão da bactéria as células do hospedeiro. Portanto, o estudo de proteínas de membrana bem conservadas nas diversas espécies e sorovares torna essencial, visto que assim elas poderiam induzir uma ampla resposta imune constituírem alvos vacinais potenciais (CULLEN et al., 2002; HAAKE et al., 1999).

A proteína Loa22 foi o primeiro fator de virulência a ser descrito em *Leptospira* spp., e é a primeira lipoproteína contendo um domínio OmpA (KOIZUMI; WATANABE, 2003). Porém, não apresentou uma proteção significativa em hamsters (33-50%) (YAN et al., 2010).

Nosso grupo busca identificar novos antígenos vacinais, procurando proteínas conservadas, preditas como sendo localizadas na membrana bactéria. Assim, foram selecionados dois genes LIC10821 e LIC10064 codificando proteínas hipotéticas, ou seja, sem função conhecida, com predição de localização de membrana. Os genes foram selecionados entre as sequências de *Leptospira* spp..

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo do trabalho foi clonar duas sequências codificadoras selecionadas no genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, LIC10821 e LIC10064, expressar e caracterizar as respectivas proteínas.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as proteínas quanto a reatividade contra soro de pacientes a fim de avaliar o potencial dessas proteínas para composição de um kit diagnóstico.
- Avaliar a localização celular das proteínas estudadas, interação com componentes de matriz extracelular e componentes de soro e imunogenicidade em modelo animal.
- Os genes que codificam estas proteínas foram avaliados quanto à presença em diferentes cepas e espécies de *Leptospira* spp..

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Componentes biológicos

Os componentes, colágeno tipo I e IV, laminina, fibronectina plasmática e celular, elastina e a albumina de soro bovino (BSA), foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. 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 adquiridos da EMD chemicals. O C4bp, isolado de soro de humanos normais, foi adquirido da Complement Technology.

3.2 Cepas bacterianas

Foram utilizadas a cepa não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1, as cepas patogênicas de *L. interrogans* (sorovares Canicola cepa Hond Utrecht IV, Copenhageni cepa M20, Hardjo cepa Harjoprajitno, Icterohaemorrhagiae cepa RGA, Kennewicki cepa Pomona Fromm), *L. kirschneri* (sorovares Cynopteri cepa 3522C, Grippotyphosa cepa Moskva V), *L. borgpetersenii* (sorovar Whitcombi cepa Whitcombi), *L. noguchi* (sorovar Panama cepa CZ214), *L. santarosai* (sorovar Shermani cepa 1342 K). As cepas foram cultivadas a 28 ºC em condições aeróbicas em meio líquido suplementado com 10% de soro de coelho, extrato de carne e peptona, contendo asparagina (0,0015% m/v), piruvato de sódio (0,001% m/v), cloreto de cálcio (0,001% m/v), cloreto de magnésio (0,001% m/v), peptona (0,03% m/v) e extrato de carne (0,02% m/v) (Turner, 1970). As culturas foram mantidas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, SP, Brasil.

3.3 Análises *in silico* das sequências codificadoras LIC10821 e LIC10064

As sequências codificadoras preditas (CDS) LIC10821 (LIC_RS04235) e LIC10064 (LIC_RS00330) foram selecionadas no genoma sequenciado de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004a; NASCIMENTO et al., 2004b) baseado principalmente na sua localização celular pelos programas: PSORT, http://psort.hgc.jp/ (NAKAI;

HORTON, 1999; NAKAI; KANEHISA, 1991)e Cello, http://cello.life.nctu.edu.tw/ (YU; LIN; HWANG, 2004). Para predição de domínios estruturais e funcionais baseados na sequência de aminoácidos, foram utilizados os programas Smart, http://smart.embl-heidelberg.de (LETUNIC et al., 2006; SCHULTZ et al., 1998), PFAM, http://pfam.xfam.org/ (FINN et al., 2006) e LipoP, http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/(JUNCKER et al., 2003). O programa ClustalW2, http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/ (LARKIN et al., 2007) foi utilizado para alinhar sequências de diferentes sorovares de *Leptospira* e assim gerar um filograma com estes dados.

3.4 Extração do DNA genômico de *Leptospira interrogans*

Foi extraído o material genético da bactéria *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 (atenuada em cultura). Para tal, foram coletados 1,5 mL da cultura de leptospiras em microtubo, e então este foi centrifugado por 2 minutos a 10.000 x g à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi repetido para outros 1,5 mL. O *pellet* formado após a centrifugação foi ressuspendido em 467 μL de tampão Tris-EDTA (TE), sendo então adicionados 30 μL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 3 μL de 20 mg/mL de proteinase K. A mistura foi homogeneizada e incubada por 1 hora a 37 ºC. Foi adicionado igual volume de uma solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), sendo então a mistura agitada até as fases se misturarem completamente. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 5 minutos, e então o sobrenadante foi recuperado. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a esta foi adicionado igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Novamente as amostras foram agitadas, centrifugadas a 12.000 x g por cinco minutos, e o sobrenadante foi coletado. Ao sobrenadante recuperado foi adicionado 1/10 volume de acetato de sódio 3 M e 0,642 volume de isopropanol. A solução foi homogeneizada e acondicionada em freezer -20 oC por 1 hora. Após centrifugação, o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 70%, sendo subsequentemente centrifugado a 8.000 x g por 10 minutos a 4 ºC. O etanol foi desprezado e 50 μL de água estéril foram adicionados para eluição do DNA. A concentração e qualidade do DNA genômico foram determinadas por leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

3.5 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*

Os genes LIC10821 e LIC10064 foram amplificados excluindo-se a sequência que codifica o peptídeo sinal, utilizando-se o DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni por PCR (quadro 1). Os produtos amplificados (amplicons) foram clonados no vetor pGEM-T easy (Promega) (Figura 2) utilizando a cepa DH5α de *E. coli*, os clones positivos selecionados por ensaio com enzimas de restrição e sequenciados pelo método de terminação de cadeia (Sanger) para a confirmação.

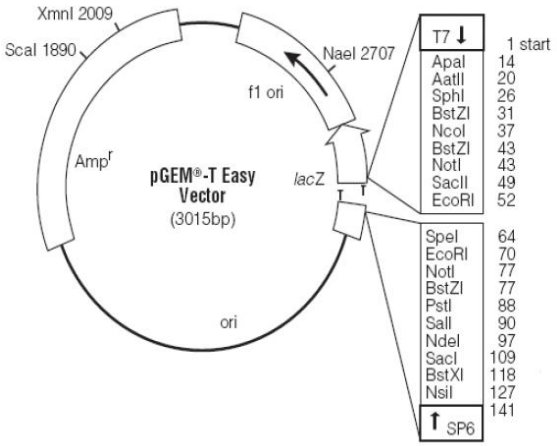

Figura 2. Vetor de clonagem pGEM-T Easy. ori: origem de replicação. Amp^r: gene de resistência a ampicilina. LacZ: gene para o metabolismo de lactose (β-galctosidase).
Fonte: Promega (2016)

Os insertos de DNA foram removidos do plasmídeo pGEM-T easy, empregando-se enzimas de restrição (quadro 1), e inseridos no plasmídeo de expressão pAE (RAMOS et al., 2004) (Figura 3), previamente digerido com as mesmas enzimas. As enzimas utilizadas foram XhoI, com sua sequência representada em vermelho no quadro 1, e KpnI, com a sequência representada em azul.

Quadro 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes por PCR

Gene	Oligonucleotídeo Foward	Oligonucleotídeo Reverso
*LIC10821	**CTCGAGAACGGAGGAAATA	***GGTACCTCAAGGATTACAAGGT
*LIC10064	**CTCGAGGGCGAAGAAGATGCAATT	***GGTACCTTATTTAACTCTAGTCCAAGTAGATTC

*Nomenclatura gênomica de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni
** Sequência de nucleotídeos referente ao sítio de restrição da enzima XhoI
***Sequência de nucleotídeos referente ao sítio de restrição da enzima KpnI

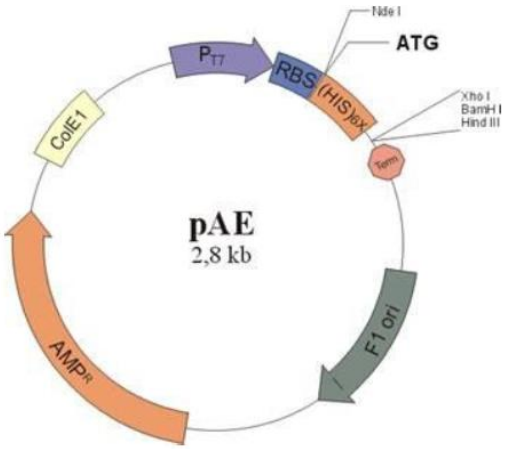

Figura 3. Vetor de expressão pAE. P_{T7}: Promotor T7. (His)6X: sequência codificadora de 6 resíduos de histidina. RBS: sítio de ligação do ribossomo. ATG: códon de iniciação da transcrição. Term: Região terminadora da transcrição.
Fonte: Ramos et al., 2004

Os plasmídeos pAE-LIC10821 e pAE-LIC10064 foram utilizados para transformar diferentes cepas de *E. coli* (Quadro 2), utilizando método descrito na literatura (HANAHAN, 1983). *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) C43 e *E. coli* BL21 (DE3) star pLysS foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (100 µg/mL) quando presente o plasmídeo pLysS. A cepa *E. coli* BL21 (SI) foi cultivada em meio 2x Yeast-Tryptone (YT) sem adição de NaCl e com adição de ampicilina (100 µg/mL). Após

transformação, as bactérias foram cultivadas até atingirem a densidade ótica de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}).

Quadro 2. Linhagens e condições de crescimento de diferentes cepas de *E. coli*

Linhagem	**Meio de Cultura**	**Temperatura**
DH5α	LB	37°C
BL21 SI	2YT/ON	30ºC
BL21 (DE3)	LB	37ºC
BL21 (DE3) Star pLysS	LB/ cloranfenicol	37ºC

Nota: LB: Meio de Cultura Luria-Bertani (0,5% extrato de levedura, 1% triptona, 1% NaCl); 2YT/ON: meio de cultura contendo 1% extrato de levedura e 1,6% triptona.

A síntese de proteína foi induzida por adição de 0,1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), exceto para a cepa BL21 (SI) na qual foi utilizado 300 mM de NaCl. As cepas que utilizam o IPTG como indutor, são as que o gene da T7 RNA polimerase estão sob a regulação do promotor forte lacUV (STUDIER, 1990). Por outro lado, a cepa BL21 SI, possui o seu gene da T7 RNA polimerase regulado por outro promotor, induzido pela variação osmótica, chamado proU (BHANDARI; GOWRISHANKAR, 1997).

Após 3 horas de indução com o indutor adequado, as bactérias foram centrifugadas a 4628 x g por 10 minutos em temperatura ambiente, o sedimento bacteriano foi ressuspendido em tampão de lise (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM de NaCl, 100 μg/mL de lisozima, 1% triton X-100, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, R). A suspensão bacteriana foi lizada em gelo utilizando-se o sonicador Branson a 60% de intensidade por 5 minutos. As frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação a 12857 x g por 10 minutos a 4 ºC. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade ao metal em colunas de sepharose impregnadas com Ni^{2+}. Para remoção de contaminantes de *E. coli* foram feitas lavagens com concentrações crescentes de imidazol. A eluição foi feita utilizando uma alta concentração (1 M) de imidazol. Proteínas encontradas na porção insolúvel foram desnaturadas utilizando-se tampão de desnaturação (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 8M uréia), e renaturadas durante a purificação por meio da passagem de soluções com concentrações decrescentes de uréia.

A eficiência da purificação foi avaliada utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12%. Após a eluição, as frações contendo maior concentração de proteínas foram unidas, e submetidas à diálise contra tampão fosfato (PBS) contendo 0,1% glicina. A quantificação das proteínas recombinantes foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford e por densitometria, comparando-as com massas conhecidas de BSA em gel SDS-PAGE.

3.5 Espectroscopia Circular (CD)

As amostras de proteínas foram dialisadas em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4, apropriado para análise por não conter íons cloro e assim não interferirem nas leituras do equipamento(JOHNSON, 1990). Os espectros foram expressos em termos de elipticidade molar residual:

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

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 (DUNCAN et al., 2005; KELLY; JESS; PRICE, 2005; WATT et al., 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 apresentada 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).

3.6 Teste de microaglutinação (MAT)

O teste de microaglutinação é o teste padrão ouro para o diagnóstico de leptospirose. Os testes são feitos no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, de acordo com Faine *et al*. (1999). Em resumo, 22 sorovares de *Leptospira* spp. São utilizados 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 são mantidas em meio EMJH. Para ser considerado MAT+ (fase convalescente) a amostra deve apresentar um título 4x maior que seu soro pareado, MAT – (fase inicial), que é considerado por um título de aglutinação menor que 100. Os soros utilizados pertencem a uma soroteca presente no Instituto Adolfo Lutz e foram gentilmente cedidos pela Doutora Eliete C. Romero para fins de pesquisa.

Em uma placa de ELISA foi imobilizado 1 μg de proteína recombinante por poço e incubado por 16 horas a 4ºC. Após a incubação, a placa foi lavada 3 vezes utilizando PBS-T. A placa foi bloqueada utilizando solução 10% leite em PBS-T (PBS + 0,05% Tween 20) por 2 horas a 37ºC. Após a lavagem do bloqueio foram utilizados os soros pareados (MAT– e MAT+) como anticorpo primário. Após 2 horas de interação a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e então adicionado o anticorpo anti-IgG humano conjugado à peroxidase e incubado por 1 hora.Após a incubação a placa foi lavada, e a reatividade revelada utilizando-se OPD em tampão citrato fosfato.

3.7 Produção e titulação dos antissoros policlonais contra rLIC10821 e rLIC10064

Para a produção de antissoro policlonal, 5 fêmeas de camundongos BALB/c (4 a 6 semanas de idade) foram imunizados pela via subcutânea com 10 μg de cada proteína recombinante. As proteínas recombinantes foram adsorvidas em uma solução 12,5% (v/v) de Alhydrogel (2% Al(OH)$_3$; Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca), usado como adjuvante. Foram realizados 2 reforços subsequentes em intervalos de 15 dias utilizando a mesma preparação descrita anteriormente. Para o grupo controle, foi administrado solução PBS contendo o adjuvante. Os animais foram sangrados pelo plexo retro orbital a cada 15 dias após a imunização, e então foram realizados *pools* dos soros e analisados os títulos dos anticorpos de cada sangria por ELISA (GAZI et al., 2011). Os títulos foram considerados pela maior diluição na qual o valor de DO_{492nm} fosse < 0,1.

Em uma placa de ELISA foi imobilizado 1 μg de proteína recombinante por poço e incubado por 16 horas a 4ºC. Após a incubação a placa foi lavada 3 vezes utilizando PBS-T. A placa foi bloqueada utilizando solução 10% leite em PBS-T por 2 horas a 37ºC. Após a lavagem do bloqueio foram utilizados os *pools* de soro dos animais como anticorpo primário, numa diluição de 1:100, e então foi realizada uma diluição seriada até 1:204800. Após 2 horas de

interação a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e então adicionado o anticorpo anti-IgG humano conjugado a peroxidase e incubado por 1 hora.Após a incubação a placa foi lavada, e a reatividade revelada utilizando-se OPD em tampão citrato fosfato.

3.8 Ensaio de acessibilidade por Proteinase K (PK)

Foram utilizados 10 mL de cultura de leptospiras (*L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20). A concentração de bactérias foi determinada por meio de contagem em câmara Petroff-Hausser em microscópio de campo escuro do número de bactérias presentes no campo central da câmara.

Número de células por mL = Nº de células contadas x Diluição x 50.000

As bactérias utilizadas se encontravam numa concentração de 10^8 células/mL (por tratamento) e foram centrifugadas a 4628 x g por 10 minutos à temperatura ambiente; o *pellet* bacteriano foi lavado com tampão PBS *low salt* contendo 50 mM NaCl (PBS ls). Após as lavagens, as *Leptospiras* foram ressuspendidas em um tampão de proteólise (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 5 mM CaCl2) contendo 25 µg/mL de proteinase K (PK) (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas entre 0 a 5 horas e a reação foi parada no tempo determinado utilizando PMSF. As suspensões foram centrifugadas a 12857 x g por 5 minutos, e o *pellet* lavado duas vezes com PBS ls. Após as lavagens, *as bactérias* foram ressuspendidas em tampão PBS ls e imobilizadas em microplaca de 96 poços. Foi realizado um ELISA utilizando os antissoros contra rLIC10821, rLIC10064 e DnaK, utilizada como controle negativo, por se tratar de uma proteína citoplasmática (GUERREIRO et al., 2001).

3.9 Ensaio de detecção das proteínas nativas na bactéria intacta

Foram utilizados 10 mL de cultura de leptospiras (*L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20). A concentração de bactérias foi determinada por meio de contagem em câmara Petroff-Hausser.

As bactérias utilizadas se encontravam numa concentração de 10^8 células/mL (por tratamento) e foram centrifugadas a 4628 x g por 10 minutos a 23 ºC e o *pellet* bacteriano foi lavado com tampão PBS ls, para manter a integridade das bactérias.

Em uma placa de 96 poços foram imobilizadas 10^7 bactérias por poço durante 16 horas a 4 ºC. A placa foi lavada 3 vezes utilizando PBS ls, e posteriormente foi bloqueada com solução contendo10% leite desnatado em pó no tampão PBS lspor 2 horas a 37 ºC. Após o bloqueio, a placa foi lavada 3 vezes com PBS ls. Posteriormente, foram adicionados os respectivos antissoros, contra proteína recombinante rLIC10821, rLIC10064 e DnaK na diluição de 1:50, 1:50 e 1:100 respectivamente, e então a placa foi incubada por 2 horas a 37 ºC. Após, a placa foi lavada 3 vezes utilizando PBS ls, e então foi incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase por 1 hora a 37 ºC. Após a incubação a placa foi lavada, e a reatividade revelada utilizando-se OPD em tampão citrato fosfato.

3.10 Ensaio de imunofluorescência

Foram coletados 10 mL de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20; após centrifugação a 4628 x g por 20 minutos os *pellets* bacterianos foram lavados duas vezes com PBS ls. A concentração das bactérias foi definida por contagem em microscópio de campo escuro.

Foram utilizadas 10^9 bactérias/tratamento para este ensaio. As bactérias foram incubadas com 200 µL de paraformaldeído 2% por 1 hora a 30 °C; após a incubação, a solução foi centrifugada a 4628 x g por 20 minutos e o *pellet* foi ressuspendido em solução BSA 3% contendo antissoro gerado contra DnaK (citoplasmática) e contra as proteínas recombinantes, rLIC10821 e rLIC10064 na diluição de 1:50. O anticorpo contra DnaK foi gerado em animal imunizado com a proteína recombinante.

As leptospiras foram incubadas por 1 h a 30 °C com a solução contendo antissoro, centrifugadas (4628 x g por 20 minutos) e o *pellet* resultante foi lavado 3 vezes com PBS ls. Por fim, as leptospiras foram incubadas com solução BSA 3% contendo iodeto de propídio (Sigma), utilizado para marcar ácidos nucléicos, na diluição de 1:20 e anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (Sigma), na diluição de 1:50 por 1 hora a 30 °C. Após esse período, a solução foi centrifugada e o *pellet* resultante foi lavado duas vezes com PBS ls.

As imagens foram captadas em microscópio confocal LSM 510 META (Carl Zeiss Inc., Alemanha), alocado no Departamento de Parasitologia do Instituto Butantan (São Paulo, SP). Foi

utilizado o aumento de 600x (FITC, excitação 488 nm, emissão de 500-550 nm; Iodeto de propídio, excitação 543 nm, emissão de 612-619 nm).

3.11 Ensaios de Immunoblotting

As proteínas recombinantes foram aplicadas em gel SDS-PAGE (12% para rLIC10821 e 15% para rLIC10064) e foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL; GE Healthcare) em equipamento semi-seco (Thermo) durante 1 hora no programa pré estabelecido pelo fabricante. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução PBS com 10% de leite em pó desnatado e 1% BSA contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) por 2 horas. Após 3 lavagens utilizando PBS-T a membrana foi incubada com anticorpo policlonal anti-rLIC10821 ou anti-rLIC10064, ou utilizando o anticorpo monoclonal contra a sequência histidinas conjugadas com peroxidase (anti-his; Sigma-Aldrich). Quando utilizados os soros policlonais produzidos em camundongos, foi utilizado o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase como anticorpo secundário de detecção. A reatividade da reação foi revelada utilizando o kit SuperSignal® West Dura (Thermo Scientific) e o fotodocumentador Gel Logic (GE Healthcare).

3.12 Interação das proteínas rLIC10821 e rLIC10064 com componentes da matriz extracelular (ECM) e do plasma

Em uma microplaca de 96 poços foram imobilizados 1 μg de laminina, colágeno tipo I, colágeno tipo IV, fibronectina celular e plasmática, elastina, plasminogênio humano, fator H, fibrinogênio, C4bp e BSA (utilizado como controle negativo de interação) em 100 μl PBS por 16 horas a 4 ºC. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T (PBS + 0,05% Tween 20) e então bloqueados com 200 μl de PBS-T contendo solução 10% (m/v) de leite em pó desnatado por 2 horas a 37 ºC.

Um micrograma de cada proteína recombinante em 100 μl de PBS foi adicionado em cada poço, permitindo uma interação entre os componentes durante 2 horas a 37 ºC. Após 6 lavagens com PBS-T, as proteínas ligantes foram detectadas adicionando o anticorpo contra cada proteína. Foi utilizado a diluição do antissoro contra a proteína recombinante referente ao valor de DO_{492nm}

igual a 1,0 nos experimentos prévios de titulação. Também foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-His conjugado com peroxidase na diluição de 1:5.000 para verificação da ligação com das proteínas recombinantes com os componentes. Após 3 lavagens com PBS-T, 100 µl do anticorpo contra IgG de camundongo produzido em coelho e conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:5.000 em PBS foi adicionado por poço e incubado por 1 hora a 37 ºC. Após a incubação os poços foram lavados 3 vezes e foi adicionado OPD (Sigma-Aldrich) (1 mg/mL) e tampão de citrato fosfato (pH 5.0) contendo 1 µl/mL de H_2O_2. A reação ocorreu por 15 minutos quando foi parada por adição de 50 µl de $H_2SO_4$2M. A leitura da placa foi realizada no comprimento de onda de 492 nm no leitor de microplacas Multiskan EX (Thermo Fisher). As análises estatísticas foram feitas comparando os valores de $DO_{(492nm)}$ da interação das proteínas recombinantes com as macromoléculas com a interação das proteínas recombinantes com o BSA, utilizando-se o teste t-student bicaudal par.

3.13 Curvas de dose-dependência

Os componentes que mostraram interação significativa com as proteínas recombinantes foram imobilizados em microplaca de 96 poços (1 µg/poço) durante 16 horas a 4 ºC. Após 3 lavagens com PBS-Tas placas foram bloqueadas com solução de PBS-T 10% (m/v) leite e 1% BSA por 2 horas a 37 ºC. Após o bloqueio a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e foram adicionadas concentrações crescentes da proteína recombinante rLIC10821 (0 a 2.7 µM, 100 µl por poço). Foi testada a ligação entre a proteína recombinante e a macromolécula após 2 horas de incubação a 37 ºC. Para a detecção da proteína recombinante foi utilizado o antissoro policlonal produzido em camundongos anti-rLIC10821 e anticorpo anti-mouse conjugado com peroxidase na diluição de 1:5000 (Sigma Aldrich), em conjunto com solução de OPD como descrito anteriormente.

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

3.14 Inibição da interação das proteínas recombinantes com componentes após incubação com antissoro policlonal

Em microplaca foi imobilizado 1 μg/poço de laminina, plasminogênio (PLG) e fibrinogênio (Fg), os quais foram incubados durante 16 horas a 4° C. A placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e então bloqueada com 200 μl de solução PBS-T contendo 10% (m/v) leite em pó desnatado e 1% BSA. Após o bloqueio, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T. Separadamente, a proteína recombinante foi incubada com seu respectivo antissoro a fim de inibir a ligação entre a proteína recombinante e o componente (laminina, PLG e Fg) por 2 horas a 37 °C. Neste experimento foram utilizados como controle, a proteína sem incubação prévia com anticorpo e a proteína incubada com o antissoro de animais inoculados com PBS. Após o bloqueio a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e então foi adicionado 1 μg de proteína recombinante previamente incubada com antissoro 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 3 lavagens com PBS-T, a ligação foi detectada utilizando o anticorpo monoclonal anti-his conjugado com peroxidase na diluição de 1:5.000 e adição de OPD como descrito anteriormente. A análise estatística foi feita comparando o percentual da ligação entre proteínas sem tratamento (100% de ligação) e proteínas tratadas com antissoro pré-imune com a proteína tratada com antissoro anti-recombinante pelo método ANOVA.

3.15 Caracterização da ligação da proteína recombinante com o PLG

Este ensaio foi realizado para determinar o papel dos resíduos de lisina na ligação entre a proteína rLIC10821 e o PLG. Em uma microplaca de 96 poços foi adicionado 1 μg de PLG/poço e incubado por 16 horas a 4 °C. Após 3 lavagens com PBS-T a placa foi bloqueada com solução PBS-T contendo 10% leite em pó (m/v) e 1% BSA. Após o bloqueio, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e então foi adicionado 1 μg de rLIC10821 co-incubada com concentrações crescentes de ácido aminocaproico (ACA; Sigma Aldrich, entre 0 a 1M), um análogo de lisina. A detecção da interação da proteína recombinante foi detectada como descrito anteriormente.

3.16 Ensaio de atividade enzimática da plasmina

Em microplaca foi imobilizado 1 µg/poço de proteína recombinante rLIC10821, rLIC10064 e BSA (controle negativo) em 100 µl de tampão PBS, durante 16 horas a 4 °C. A placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e bloqueada por 2 horas a 37 °C com PBS-T contendo 10% (m/v) leite em pó desnatado. Após o bloqueio a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e então 1 µg de PLG humano foi adicionado em cada poço e a placa foi incubada por 2h a 37 °C. Novamente, a placa foi lavada 3 vezes e então foram adicionados 4 ng da enzima uroquinase humana (uPA; Sigma Aldrich), ativador de PLG, e em sequência foi adicionado o substrato D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride (Sigma-Aldrich) na concentração final de 0,4 mM em 100 µl de PBS. A placa foi incubada durante 16 horas a 37 °C e a degradação do substrato cromogênico foi expressa na DO_{405nm} obtida. Foram utilizados controles nos quais pelo menos um dos componentes da reação foi omitido.

3.17 Inibição da formação do coágulo de fibrina

A proteína recombinante rLIC10821 (1650 nM) foi incubada com fibrinogênio 1 (µg/µL) por 2 horas a 37 °C. Foram colocados 90 µL da solução de fibrinogênio mais proteína rLIC10821 em cada poço de uma placa de ELISA, bem como 10 µL de uma solução de 10 U/mL de trombina (Sigma), para iniciar a formação do coágulo de fibrina. A reação foi prolongada por 45 minutos e foi empregado um controle negativo, no qual a trombina foi omitida da reação, e um controle positivo, onde não houve incubação de proteína recombinante com o fibrinogênio, ou seja, nesta situação a formação do coágulo está livre de interferência.

A formação do coágulo foi medida por meio de leitura de turbidez no comprimento de onda de 600 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de formação de coágulo, sendo a turbidez do coágulo no tratamento sem incubação com recombinante, ao final da cinética, considerada 100%.

A porcentagem do coágulo formado no tratamento com a proteína recombinante foi comparada com a porcentagem do coágulo do controle positivo, pelo teste t-Student, e um valor de p abaixo de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3.18 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas, foram utilizados teste t-Student e teste ANOVA, considerando um p-valor menor que 0,05 estatisticamente significativo.

3.19 Comitê de Ética animal e Humana

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan sob o protocolo 1193/14. A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan segue as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

A Comissão de Ética em Pesquisa com seres humanos (CEP_{SH}) certificou que o trabalho realizado não envolve manipulação humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por esta Comissão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises *in silico* dos genes selecionados

Os genes LIC10821 e LIC10064 foram selecionados do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al.,2004b), a partir da análise *in silico* feita por programas disponíveis em servidores públicos.

O programa LipoP prediz genes que codificam lipoproteínas, baseado na presença de uma sequência consenso denominada lipobox, na qual a presença de um resíduo de cisteína indica que a proteína será lipidada. Comparando sequências do peptídeo sinal de bactérias gram-negativas, foi proposto por Wu, em 1996 o lipobox em *E. coli* (WU, 1996). Nas espiroquetas, o lipobox está representado segundo a sequência consenso Leu (Ala, Ser)$_{-4}$-Leu(Val,Phe,Ile)$_{-3}$-Ile(Val,Gly)$_{-2}$-Ala(Ser,Gly)$_{-1}$-Cys$_{+1}$que foi proposta por Haake (2000) após comparação e análise de 26 sequências conhecidas de lipoproteínas de Treponema spp, Borrelia spp e Leptospira spp (HAAKE, 2000).

Utilizando-se o software LipoP, verificamos que ambos os genes selecionados LIC10821 e LIC10064 codificam proteínas que possuem um sítio de clivagem para a enzima sinal peptidase, portanto, provavelmente serão destinadas à membrana da bactéria. A proteína codificada pelo gene LIC10064 apresentou o sítio de clivagem SPI, indicando ser uma proteína de membrana, porém excluindo a possibilidade de ela ser uma lipoproteína (HAAKE *et al.*, 1993); por outro lado, a proteína LIC10821 possui o sítio SPII, indicando ser uma provável lipoproteína.As maiorias das lipoproteínas de Leptospira estão presentes em sua membrana externa (HAAKE, 2000). A enzima sinal peptidase II é responsável pela clivagem do peptídeo sinal e pela lipidação dos resíduos de cisteína.

Utilizando os algoritmos de predição funcional de proteínas de bactérias Gram-negativas PSORT (NAKAI; HORTON, 1999) e CELLO (YU; LIN; HWANG, 2004), a proteína codificada pelo gene LIC10064 foi predita como proteína periplasmática e a proteína codificada pelo gene LIC10821 foi predita como proteína de membrana externa.

Ambas as proteínas possuem domínios de função desconhecidas (DUF), DUF1565 (LIC10821) e DUF2147 (LIC10064) de acordo com o banco de dados do servidor PFAM (FINN et al., 2006). Na proteína codificada pelo gene LIC10821 verificou-se a presença do domínio estrutural conservado PbH1 (Parallel Beta-Helix repeat) pela ferramenta SMART (LETUNIC et

al., 2006; SCHULTZ et al., 1998). Este domínio geralmente está ligado a enzimas que possuem substratos polissacarídeos (JENKINSet al., 1998).

O quadro 3 mostra, resumidamente, a análise *in silico* feita para os genes selecionados para o estudo:

Quadro 3: Resumo das análises *in silico* dos genes estudados

Gene	**Descrição Predita**	**Sítio de Clivagem**	**Domínio conservado**
LIC10064	Periplasmática	26-27 (SPI)	*DUF2147
LIC10821	Membrana externa	21-22 (SPII)	*DUF1565, **Pbh1

*DUF – *Domain of Unknow Function*

**Pbh1 – Domínio estrutural, *Parallel Beta-Helix repeat*

4.2 Análise da presença dos genes nos diversos sorovares de *Leptospira*

As *Leptospiras* são bactérias com uma grande variabilidade antigênica devida à resposta heterogênea aos lipopolissacarídeos presentes em sua membrana (LEVETT, 2001), portanto proteínas que sejam conservadas entre suas diversas espécies e sorovares são importantes quando se trata do estudo de um antígeno vacinal em potencial.

Para avaliar a presença dos genes estudados em outras espécies e/ou sorovares utilizamos a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), seguida de um alinhamento múltiplo com sequências de similares. A partir do alinhamento múltiplo fomos capazes de gerar um filograma a partir das sequências de aminoácidos, ilustrado na figura 4. Podemos observar a similaridade da proteína codificada pelo gene LIC10064 com as cepas patogênicas, principalmente da espécie *L. interrogans.* Uma sequência similar também foi encontrada nas bactérias saprofíticas, *L. biflexa* sorovar Patoc (41%), *L. wolbachii* sorovar Codice (40%), *L. vanthielli* sorovar Holland (40%), *L. terpstrae* sorovar Hualin (39%) e *L. meyeri* sorovar Hardjo (39%), porém todos com baixa

identidade. A proteína LIC10821 apresentou maior identidade com as proteínas presentes nas espécies e sorovares patogênicos, e não foi identificada nas bactérias saprofíticas, sugerindo uma importância para a patogênese da bactéria.

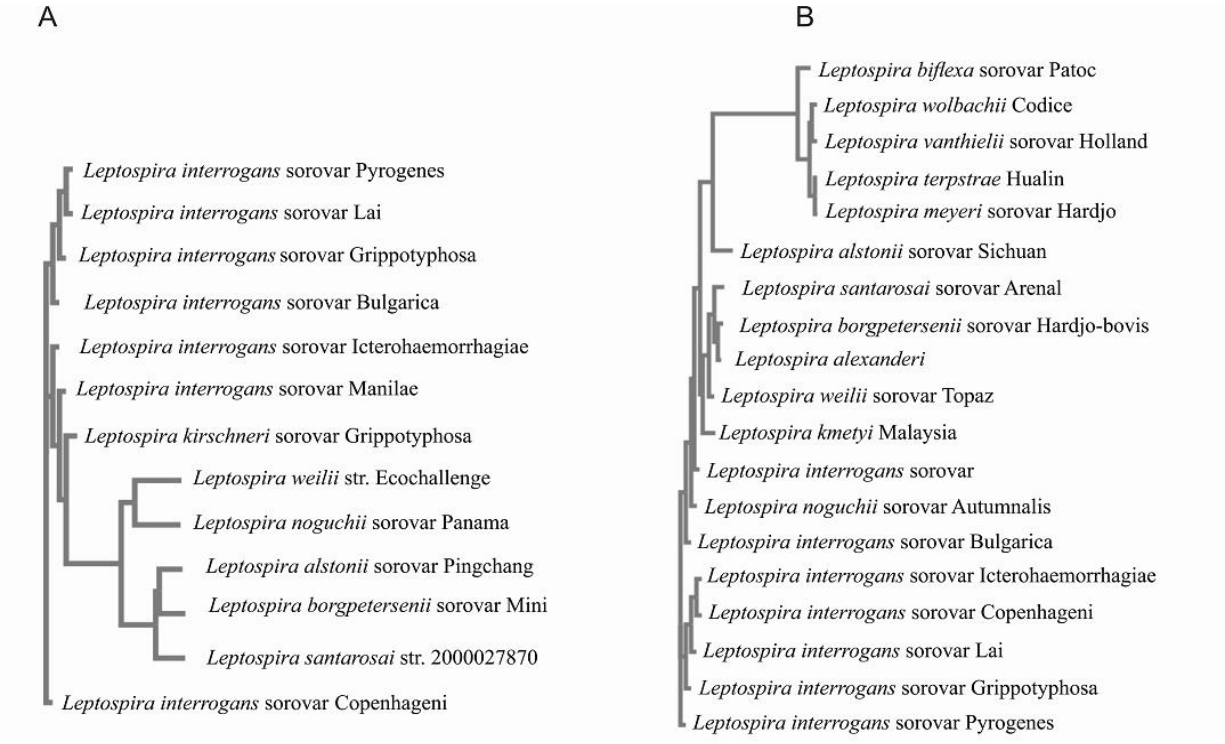

Figura 4. Filogramas obtidos pelo software clustal omega para o alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de diversas espécies e sorovares de *Leptospira*: A). Resultados obtidos para LIC10821. B) Resultados obtidos para LIC10064.

4.3 Clonagem dos genes selecionados

As sequências de DNA correspondentes aos genes LIC10821 e LIC10064 foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico extraído de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, utilizando-se os oligonucleotídeos previamente descritos no quadro 1.

Os produtos obtidos após a PCR (Figura 5 A e B) foram utilizados para a clonagem em vetor pGEM-T Easy (Promega). Após as bactérias competentes serem transformadas com a construção gene-pGEM-T Easy, clones positivos pela seleção azul/branco foram selecionados para extração plasmidial e subsequentemente foram submetidos a ensaio com enzimas de restrição para a análise da liberação do inserto de tamanho esperado em gel de agarose. Após a

digestão com as enzimas específicas fomos capazes de observar a liberação do inserto no tamanho esperado para cada gene, aproximadamente 1 kb (LIC10821) e 500 pb (LIC10064).

Os insertos removidos do plasmídeo pGEM-T easy foram utilizados para ligação ao plasmídeo de expressão pAE, o qual diferentemente do pGEM-T Easy, não possui um diferencial de seleção em relação as colônias positivas e negativas, logo foi necessária uma extração plasmidial por fenol-clorofórmio de diversas colônias para análise dos clones positivos.

Utilizando a extração rápida por fenol-clorofórmio, foram selecionados alguns clones, possivelmente positivos, ou seja, apresentaram um aumento de massa em relação ao vetor selvagem, o que indica a inclusão do inserto de interesse no vetor. As construções para o gene LIC10064 foram submetidas a outro tipo de seleção, pois por fenol clorofórmio não foi possível distinguir uma diferença significativa entre o plasmídeo contendo o inserto, do plasmídeo sem o inserto, devido ao pequeno tamanho do gene.

Para selecionar clones positivos contendo o gene LIC10064, utilizamos o PCR de colônia. Foi realizado um PCR convencional como descrito anteriormente, porém com o DNA total das colônias das bactérias utilizados como molde. Por conter os *primers* referentes ao gene LIC10064 podemos observar uma banda do tamanho esperado do gene em gel de agarose.

Após a seleção de genes possivelmente positivos, os mesmos foram submetidos a ensaios com enzimas de restrição onde foi possível determinar a presença do inserto de interesse (figuras 5C e D), e confirmados em seguida por sequenciamento automático. Ambos os genes foram clonados com sucesso, não apresentaram nenhuma mutação e apresentaram em fase de leitura.

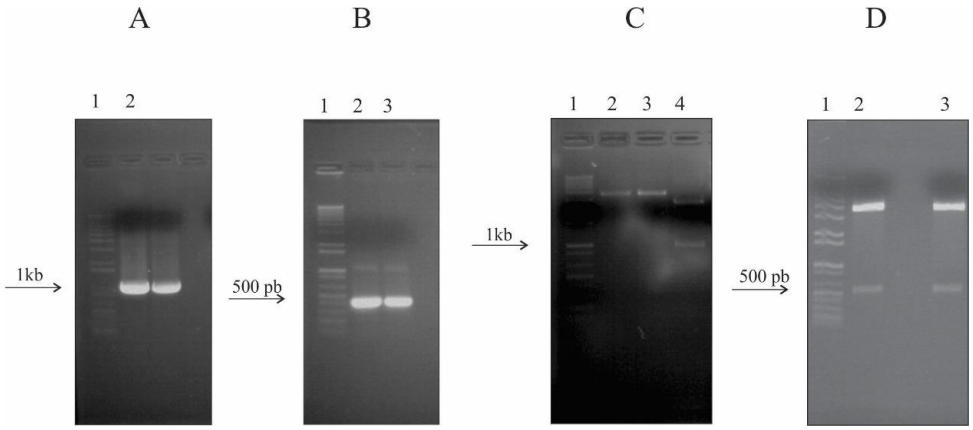

Figura 5. Análise dos fragmentos de DNA obtidos por amplificação em reação de PCR; análise dos fragmentos de DNA após digestão do plasmídeo pAE-LIC em gel de agarose:LIC10821 (A) com aproximadamente 1 kb e LIC10064 (B) com aproximadamente 500 pb em gel de agarose. C) Digestão do plasmídeo pAE-LIC10821 utilizando as enzimas de restrição *XhoI* e *KpnI* e a liberação do inserto, 1 marcador 1 kb DNA Plus Ladder, 2 digestão com apenas 1 enzima (XhoI), 3 Digestão com 1 enzima (KpnI), 4 digestão com ambas enzimas e liberação do inserto na altura esperada de 1 kb. D) Digestão do plasmídeo pAE-LIC10064. 1 marcador 1 kb DNA Plus Ladder, 2 e 3 digestão utilizando ambas enzimas XhoI e KpnI e liberação do inserto na altura esperada de 500 pb.

4.4 Expressão das proteínas recombinantes

Foi feito um estudo preliminar de indução de diferentes cepas de *E. coli* BL21 SI, BL21 (DE3) e BL21 (DE3) Star pLysS com altas concentrações dos indutores.

As cepas previamente descritas foram transformadas com as construções LIC10821-pAE e LIC10064-pAE e induzidas com concentrações de 0,1 mM de IPTG nas cepas que utilizam este indutor, e 300 mM de NaCl na cepa BL21 SI. Após a indução, as bactérias foram lisadas utilizando sonicador e as frações obtidas após centrifugação (sobrenadante e *pellet*) foram submetidas à análise por SDS-PAGE 12% (Figura 6).

Foi feito um ensaio de *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-His, contra a sequência de 6 resíduos de histidinas, para confirmar a expressão das proteínas recombinantes (Figura 4). Foi utilizada a proteína Lsa63 (VIEIRA et al., 2010) como controle positivo. A proteína Lsa63 foi clonada previamente em vetor pAE (RAMOS et al., 2004) e por isso também possui a sequência de 6 resíduos histidinas.

A proteína rLIC10821 foi expressa de modo similar em todas as linhagens testadas; em todas as cepas, a proteína foi melhor expressa em corpúsculo de inclusão, sendo observada em sua maioria na fração insolúvel. Por outro lado, a proteína rLIC10064 foi melhor expressa na

fração solúvel principalmente na cepa BL21 SI. A proteína rLIC10821 possui o tamanho aproximado de 37 kDa enquanto a proteína rLIC10064 possui aproximadamente 18 kDa.

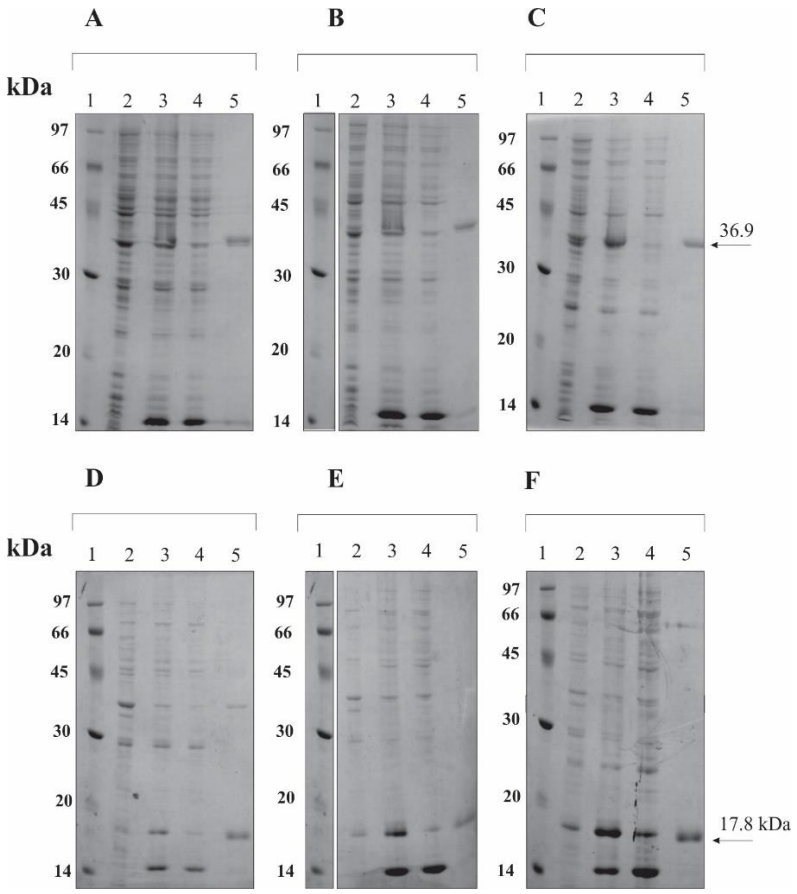

Figura 6. Análise da expressão das proteínas recombinantes em diferentes cepas de *E. coli* em gel SDS PAGE 12%: A, B e C) Expressão da proteína rLIC10821 utilizando as cepas BL21 DE3 C43 (0,1 mM IPTG), BL21 DE3 (0,1 mM IPTG) e BL21 SI (300 mM NaCl) respectivamente. D E e F) Expressão da proteína rLIC10064 utilizando as cepas BL21 DE3 C43 (0,1 mM IPTG), BL21 DE3 (0,1 mM IPTG) e BL21 SI (300 mM NaCl) respectivamente. Em todos os géis 1 é o marcador LMW. 2 é a cepa transformada com a construção pAE-LIC mas não induzida. 3 é a fração total após a lise, englobando tanto a fração solúvel quanto insolúvel. 4 apenas a fração solúvel. 5 apenas a fração insolúvel. As proteínas recombinantes estão indicadas nos géis por uma seta, com aproximadamente sua massa molecular.

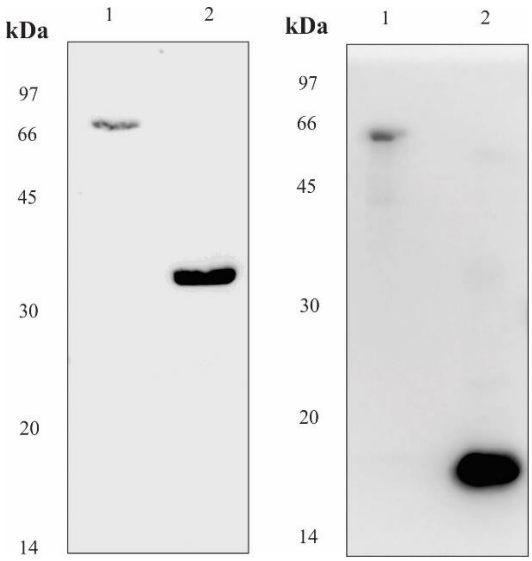

Figura 7. Detecção das proteínas recombinantes por *Western Blotting* utilizando o anticorpo monoclonal anti-his. As proteínas foram aplicadas em gel SDS PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-his conjugado com peroxidase. Em todos os géis 1 corresponde ao controle a proteína Lsa63, que foi clonado em vetor pAE logo é possível detecta-la com o anticorpo anti-his. Em 2 são as proteínas recombinantes rLIC10821 (A) e rLIC10064 (B).

4.5 Purificação e diálise das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas recombinantes foi feita por cromatografia de afinidade à metal, utilizando coluna com resina de sefarose (*Chelating Sepharose*, GE Healthcare) tratada com cátions de níquel. As proteínas recombinantes são expressas com uma sequência de 6 resíduos de histidinas em sua porção N-terminal, devido ao plasmídeo utilizado, pAE (RAMOS et al., 2004). Os anéis imidazólicos presentes nos resíduos de histidina possuem uma alta afinidade ao níquel, e ao passarem pela coluna impregnada com este metal se ligam à eles; além das proteínas recombinantes, alguns contaminantes da cultura bacteriana se ligam fracamente, sendo então lavados com tampão contendo baixa concentração de imidazol. O imidazol compete com as histidinas pela ligação ao níquel, portanto podemos eluir as proteínas recombinantes utilizando alta concentração deste composto.

Como a proteína rLIC10821 foi obtida na forma insolúvel, foi necessária sua solubilização em tampão de desnaturação contendo 8M ureia, a qual foi posteriormente removida. A renaturação da proteína foi feita durante a purificação em coluna com gotejamento lento da mesma em tampão de renaturação (Figura 8).

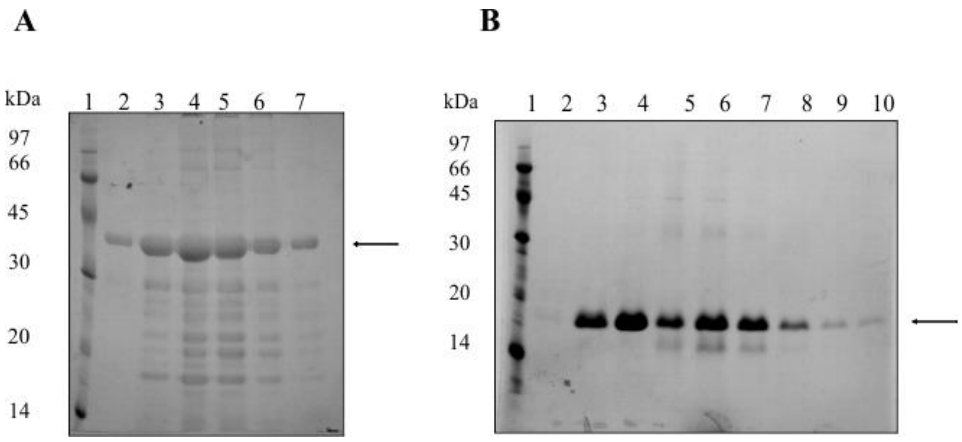

Figura 8. Análise do processo de purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade ao metal.A proteína recombinante rLIC10821 (A) foi expressa em corpúsculo de inclusão, desnaturada com uréia 8M e renaturada por gotejamento em coluna, utilizando método pré-programado no aparelho Akta Prime para proteínas insolúveis, já a proteína rLIC10064 (B) foi expressa na porção solúvel, e foi utilizado o método pré-programado no aparelho Akta Prime para proteínas solúveis. As proteínas foram obtidas nas concentrações de 0,1 µg/µL e 0,3 µg/µL para as proteínas rLIC10821 e rLIC10064, respectivamente.

Após a diálise em tampão PBS, a concentração das proteínas foi estimada por comparação com massas pré-estabelecidas de BSA, por meio do software GelQuant (DNR Bio-Imaging Systems Ltd), que utiliza relações de densitometria para estimar as massas das bandas de interesse. As concentrações foram de 0,1 µg/µL da proteína rLIC10821 e de 0,3 µg/µL da proteína rLIC10064.

Após a obtenção das proteínas recombinantes purificadas, estas foram submetidas a espectroscopia circular (CD) para verificar se após o processo de purificação elas apresentavam a conformação esperada. Após a obtenção do espectro, o mesmo foi analisado pelo programa CAPITO (WIEDEMANN; BELLSTEDT; GORLACH, 2013). Foi possível verificar que ambas as proteínas demonstraram um perfil estruturado, apresentando estrutura secundária predominantemente de folha beta (41%) e irregular (51%) no caso da proteína rLIC10821; e folha beta (44%) e irregular (56%) na proteína rLIC10064 (Figura 9 e Quadro 4).

Quadro 4. Resultados da análise do espectro obtido por CD pelo software CAPITO

Estrutura secundária	Porcentagem predita	Porcentagem experimental
alfahélice **rLIC10821**	10%	4%
folhabeta **rLIC10821**	52%	41%
irregular**rLIC10821**	38%	51%
alfahélice **rLIC10064**	24%	2%
folhabeta **rLIC10064**	49%	44%
irregular**rLIC10064**	27%	56%

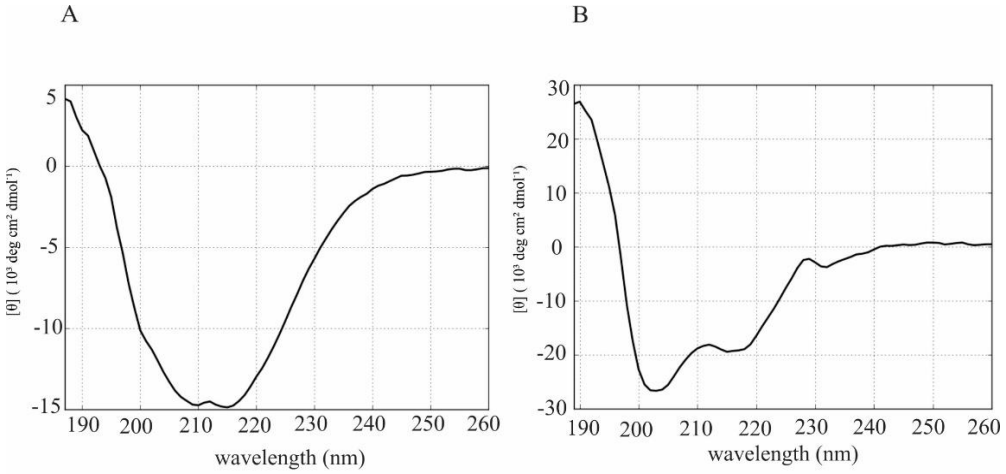

Figura 9. Espectroscopia Circular (CD): Espectros de dicroísmo circular para as proteínas rLIC10821 (A) e rLIC10064 (B). O espectro foi medido usando uma célula de 1 mm e apresentado como uma média de 5 leituras.

4.6 Avaliação Imunológica

Ambas as proteínas foram capazes de induzir uma resposta imune em animais inoculados, sendo que a proteína rLIC10064 apresentou um título maior em relação a proteína rLIC10821 (Figura 10). A especificidade dos anticorpos foi ensaiada por *Western Blotting* utilizando os anticorpos gerados nos camundongos, resultando em uma banda majoritária na altura esperada da respectiva proteína, figura 11.

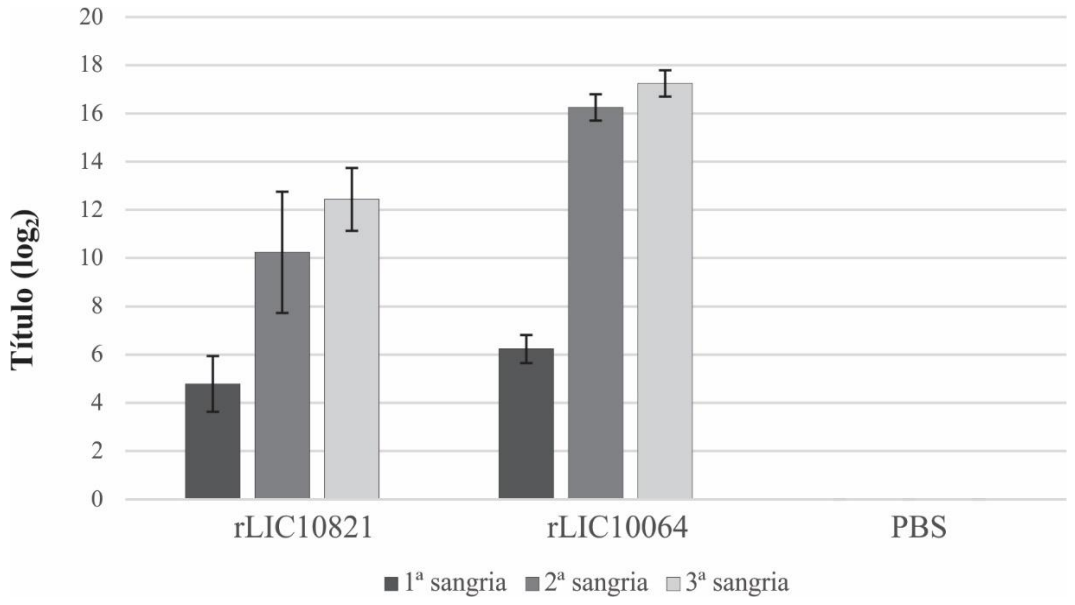

Figura 10. Resultadosobtidos na titulação dos sorosde camundongos BALB/c imunizados com as proteínas rLIC10821 e rLIC10064: Em placa de ELISA foi imobilizado 1 µg por poço de proteína recombinante. A placa foi incubada com o soro obtido após cada sangria de cada animal, numa diluição de 1:100 e então foi feita uma diluição seriada até 1:204800. Então a interação entre a proteína e o soro de camundongo foi sondada utilizando anticorpo contra IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000. O título foi considerado na diluição onde a interação entre antígeno e anticorpo apresentou uma absorbância de 0,1. Os dados estão expressos em logaritmo de base 2.

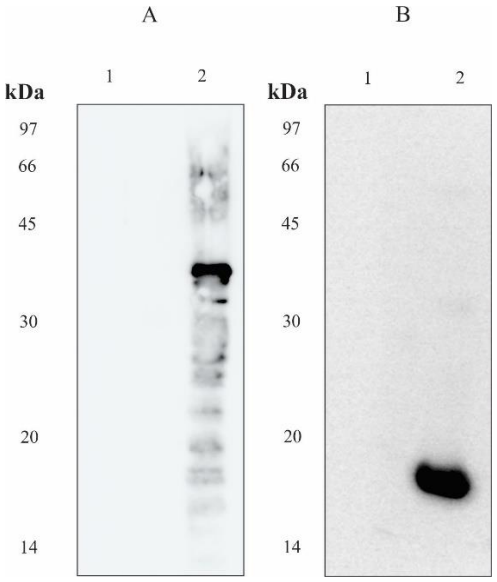

Figura 11. Detecção das proteínas recombinantes por *Western Blotting* utilizando o anticorpo policlonal anti-rLIC. As proteínas foram aplicadas em gel SDS PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com os antissoros anti-rLIC10821 e anti-rLIC10064 e incubado com anticorpo anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Em todos os géis 1 corresponde ao controle

a proteína Lsa63, utilizada como controle negativo. Em 2 são as proteínas recombinantes rLIC10821 (A) e rLIC10064 (B).

4.7 Avaliação da localização celular

Existe uma grande importância no estudo de proteínas de membrana externa, quando se trata de patogênese e potencial imune de uma proteína. Proteínas de membrana externa são o primeiro contato entre o patógeno e o hospedeiro, sendo assim, podem gerar uma grande resposta imune e estão intimamente ligadas à patogenicidade da bactéria (HAAKE, 2000).

A proteína codificada pelo gene LIC10821 foi predita como uma proteína de membrana externa pelo algoritmo para bactérias Gram-negativas do programa Cello (YU; LIN; HWANG, 2004), por outro lado, a proteína rLIC10064 foi predita como uma proteína periplasmática. Para confirmar experimentalmente tais predições, foram realizados diversos ensaios para determinar a localização celular.

4.7.1 Ensaio de acessibilidade por Proteinase K (PK)

No ensaio de acessibilidade por proteinase K, submetemos *Leptospiras* à degradação pela proteína de amplo espectro PK, por intervalos de tempo de 0, 1, 3 e 5 horas. Com isso podemos comparar o valor de densidade ótica inicial com os valores subsequentes. Visto que as bactérias estavam intactas, apenas as proteínas de superfície são submetidas à interação com a enzima proteinase K. Logo, apenas as proteínas de membrana são degradadas, ou seja, se houver uma diminuição do sinal das proteínas testadas, podemos inferir que as mesmas estão localizadas na membrana externa. Para este ensaio utilizamos como controle negativo a proteína DnaK, previamente descrita como uma proteína citoplasmática (GUERREIRO et al., 2001).

Após 5 horas, podemos observar que houve uma diminuição no valor de absorbância de ambas as proteínas, sugerindo a presença das mesmas na membrana externa. Corroborando com este resultado, podemos observar que a proteína citoplasmática DnaK, que não se encontra acessível para a proteinase K, não houve uma alteração significativa em sua absorbância, mesmo após 5 horas de interação (Figura 12).

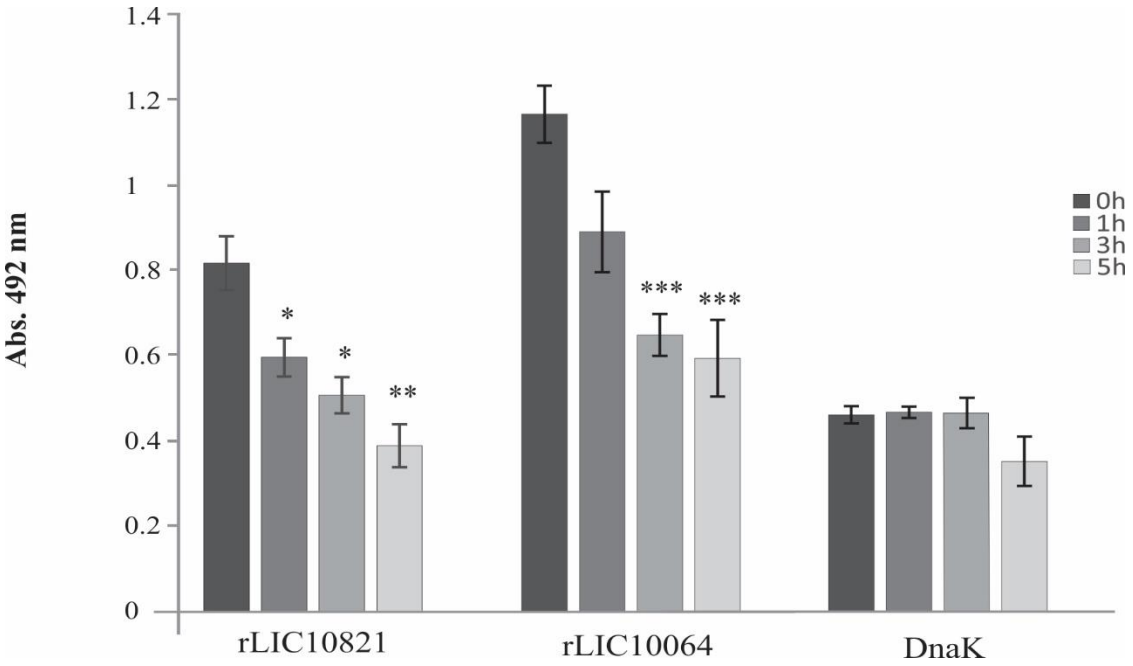

Figura 12. Ensaio de acessibilidade das proteínas recombinantes por Proteinase K (PK). Em uma placa de ELISA foram imobilizadas *Leptospiras* previamente tratadas com proteínase K em diferentes intervalos de tempo, 0, 1, 3 e 5h. Após a incubação as amostras foram incubadas com os respectivos antissoros que por sua vez foram sondados pelo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Para análise estatística, foi feita comparação das médias dos grupos por ANOVA, seguido de pós teste de Tukey (*p<0,1, **p<0,01, ***p<0,001).

4.7.2 Ensaio de bactéria intacta

Para dar continuidade aos ensaios onde avaliamos a localização celular das proteínas, utilizamos *L.interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, imobilizadas em placa ELISA, e incubamos as mesmas com antissoro das proteínas testadas. Como controle, excluímos um dos componentes do sistema (Figura 13).

Foi possível identificar as proteínas nativas das bactérias utilizando o antissoro produzido em camundongo e previamente titulado contra *Leptospira*.

Os resultados sugerem a presença de ambas as proteínas na membrana externa, visto que o antissoro produzido em camundongos foi capaz de reconhecer as mesmas em *Leptospiras* intactas. O maior sinal da proteína rLIC10064 pode estar relacionado ao seu maior número de cópias na bactéria (MALMSTROM et al., 2009).

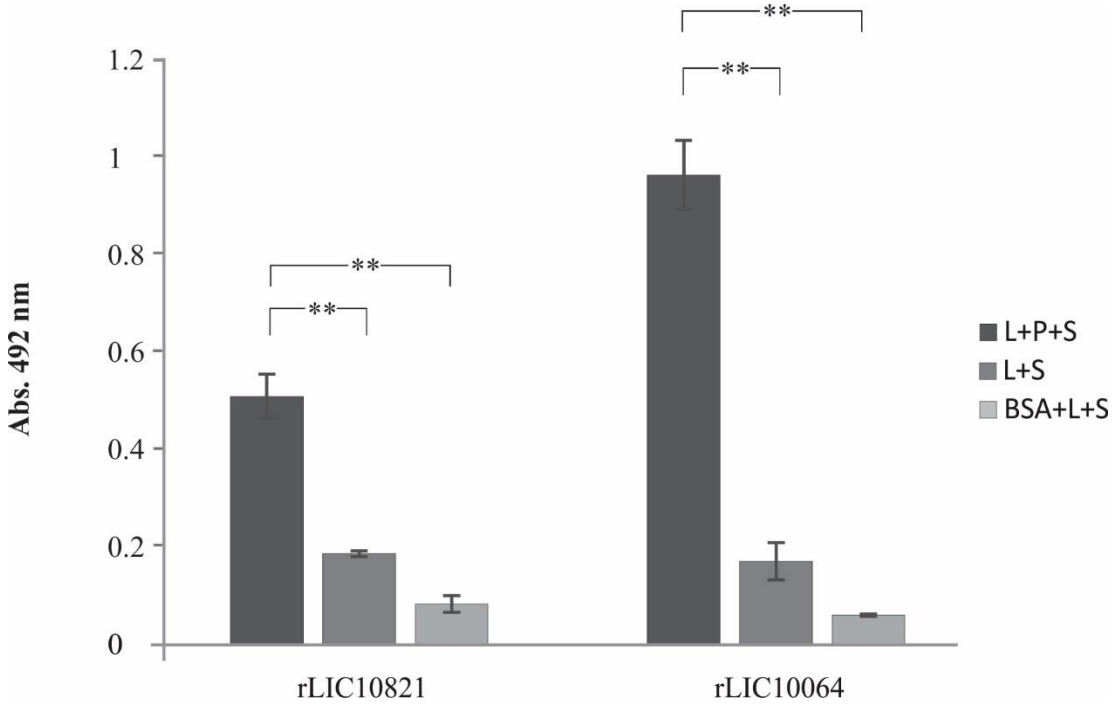

Figura 13. Avaliação da localização celular das proteínas codificadas pelos genes LIC10821 e LIC10064 em bactéria intacta. Em placa de ELISA foram imobilizadas *Leptospiras* na concentração de 10^9/mL em tampão PBS ls. Em seguida foram adicionados os antissoros respectivos de cada proteína recombinante, 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-rLIC) e S para o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Para análise estatistica, foi feita comparação das médias dos grupos por ANOVA, seguido de pós teste de Tukey (**p<0,01).

4.7.3 Ensaio de imunofluorescência

Neste ensaio, as bactérias foram incubadas com os respectivos antissoros produzidos em camundongos, que por sua vez foram sondados por anticorpos anti-IgG de camundogos conjugados com fluoróforos. Asleptospiras foram coradas com iodeto de propídio, que marca o DNA da bactéria, e assim podemos localiza-las no campo do microscópio (Figura 13).

Como dito anteriormente, a proteína codificada pelo gene LIC10064 teve seu número de cópias determinada no trabalho de proteômica quantitativa (MALMSTROM et al., 2009) e apresenta cerca de mil cópias por bactéria. Já a proteína LIC10821 apesar de ser sido identificada, não foi quantificada por estar abaixo do limite de detecção da metodologia utilizada. Fomos capazes de observar ambas as proteínas na membrana externa das bactérias (Figura 14). Assim

como nos ensaios anteriores, foi utilizada, como controle negativo, a proteína DnaK sabidamente uma proteína citoplasmática.

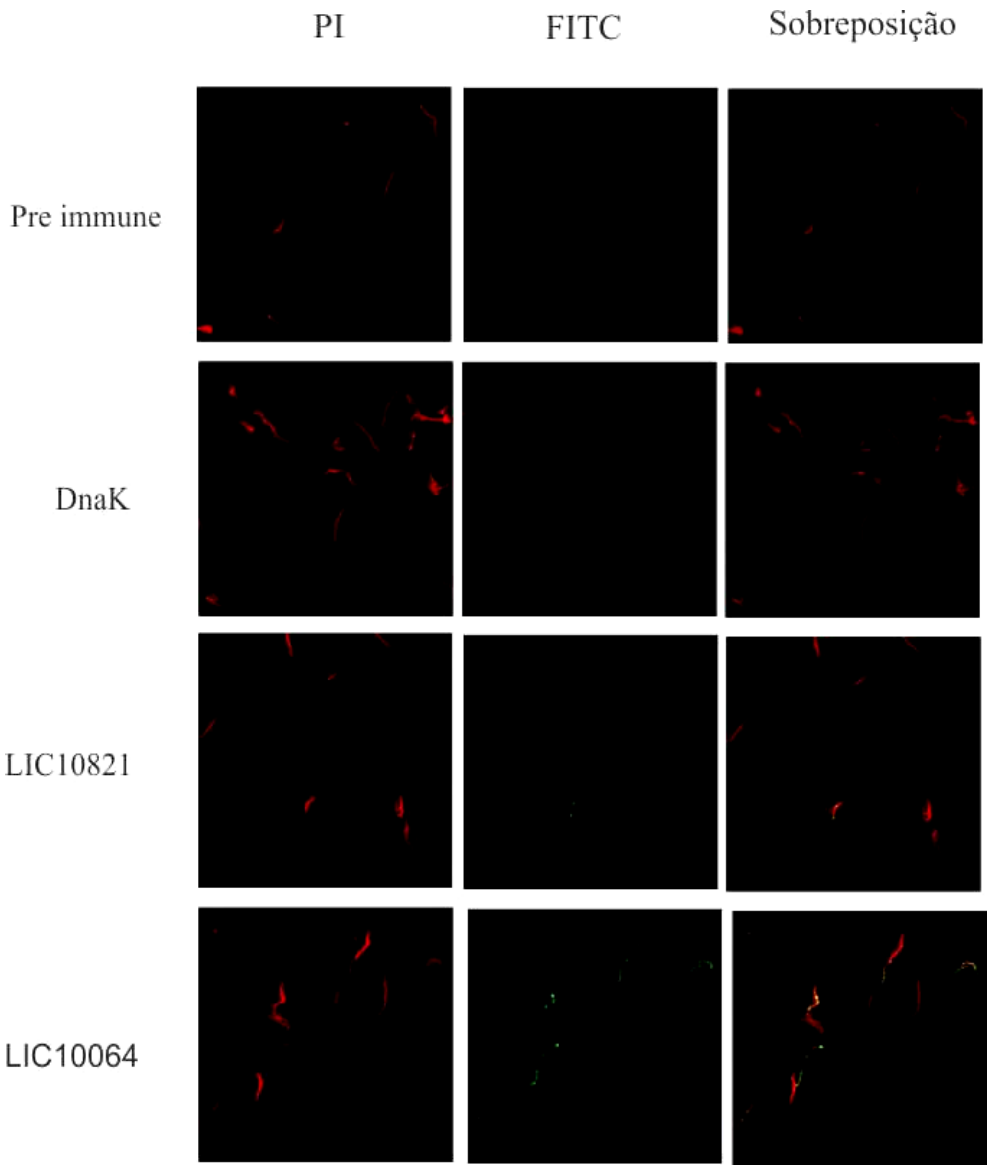

Figura 14. Ensaio de localização celular por imunofluorescência: As bactérias foram incubadas com Iodeto de propídio (vermelho), com o anticorpo contra a respectiva proteína e com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com o fluoróforo FITC (verde). A primeira coluna PI, apenas o filtro da cor vermelha esta ligado, com isso podemos ver a presença de células no campo de visão. Na segunda coluna FITC, apenas o filtro verde esta ligado, com isso localizamos os pontos onte houve interação do anticorpo anti-IgG de camundongo com o anticorpo contra as proteínas estudadas. Já na terceira coluna, foi feita sobreposição de ambas imagens, e com isso podemos observar que os pontos verdes, respectivos a proteína, estão coincidentes a localização das bactérias, indicando a presença destas proteínas em sua membrana. Além disso, nos controles negativos utilizados (Não imune e DnaK), podemos observar a ausência de pontos verdes.

4.8 Reatividade com soro de pacientes

Realizamos este ensaio com o intuito de avaliar a presença das proteínas estudadas durante a infecção, e em qual fase da doença (MAT+ ou MAT-) seria observada maior reatividade. Com este resultado, seria possível analisar o potencial destas proteínas como marcadores de diagnóstico para leptospirose. O *cutoff*, calculado a partir da reação com os soros de humanos saudáveis, para o ensaio com rLIC10821 foi de 0,14 e de 0,16 para rLIC10064. A reatividade obtida para a proteína rLIC10821 foi de 55% para MAT- e 56% para MAT+, já para a proteína rLIC10064 foi de 13 % para MAT- e 6% para MAT+ (Figura 15). A proteína rLIC10821 possui um potencial para compor um kit diagnóstico, já que conseguiu ser detectada por aproximadamente metade dos pacientes testados, na fase inicial da doença (MAT -) indicando sua expressão precoce durante a infecção. Por outro lado, a proteína rLIC10064 apresentou uma baixa reatividade, tanto na fase inicial (MAT -) quanto na fase convalescente (MAT +) com os pacientes testados.

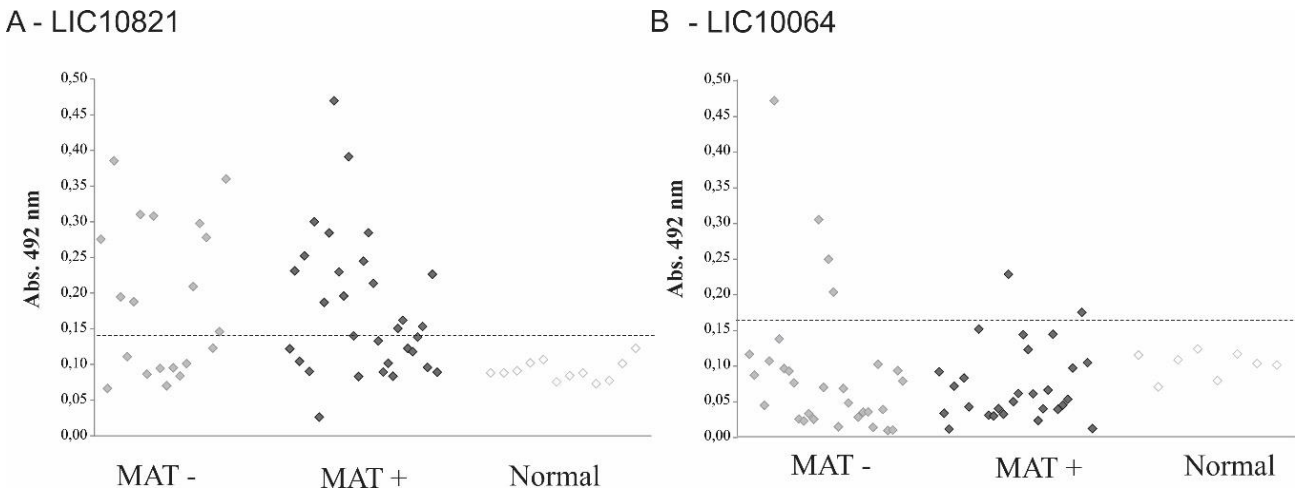

Figura 15. Avaliação da reatividade dos pacientes diagnosticados com leptospirose com as proteínas rLIC10821 e rLIC10064. As proteínas rLIC10821 (A) e rLIC10064 (B) foram imobilizadas em placa de ELISA (1 µg/poço) e inoculados com soros pareados de pacientes diagnosticados com leptospirose, na fase convalecente (MAT +) e na fase inicial (MAT -), na diluição de 1:100. A detecção da reatividade foi feita por incubação com anti-IgG humano conjugado com peroxidase (1:3000). Os respondedores são considerados aqueles acima do valor do cutoff (linha pontilhada horizontal), definida como a média dos pacientes saudáveis somada três vezes o desvio padrão.

Quadro 5. Reatividade do soro de pacientes infectados contra as proteínas recombinantes estudadas.

Proteína	**MAT-**	**MAT+**
rLIC10821	55%	56%
rLIC10064	13%	6%

4.9 Presença da proteína em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* spp.

A presença da proteína LIC10064 em extratos de *Leptospira* foi avaliada por *Western Blotting* (Figura 16). Os extratos proteicos foram separados em SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com antissoro anti-rLIC10064 e subsequentemente anti-IgG de camundongo.Foi possível observar a presença da proteína rLIC10064 em praticamente todos os extratos utilizados neste ensaio. Apenas a proteína da *L. biflexa* sorovar Patoc não foi reconhecida pelo antissoro anti-rLIC10064.

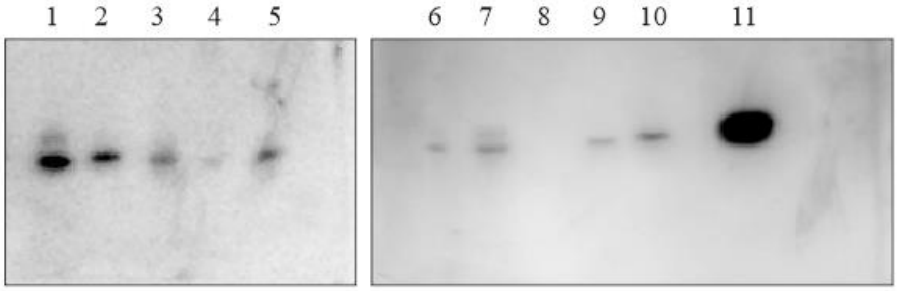

Figura 16. Análise da presença da proteína rLIC10064 em diferentes espécies e cepas de *Leptospira* spp.por Western Blotting. Diversos extratos de *Leptospira* foram carregados em gel SDS PAGE 12% etrasnferidos para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com anticorpo contra rLIC10064 e com anticorpo contra IgG de camundongo conjugado com peroxidase. 1) *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M-20, 2) *L. kirshneri* sorovar Grippothyphosa, 3) *L. kirshner*i sorovar Cynoptery, 4) *L. borgpetersenii*, 5) *L. interrogans* sorovar Canicola, 6) *L. interrogans* sorovar Hardjo, 7) *L. santarosai* sorovar Shermani, 8) *L. biflexa* sorovar Patoc, 9) *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1-130, 10) *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pommona Fromm, 11) rLIC10064 purificada (controle positivo)

A proteína referente ao gene LIC10821 não foi detectada nos extratos de *Leptospira* spp..Isso pode ser explicado pelo provável baixo número de cópias destas proteínas na bactéria, uma vez que a proteína foi identificada no proteoma quantitativo em *L. Interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 (cepa virulenta), porém não foi quantificada, pois o número de cópias ficou abaixo do limite de detecção (MALMSTROM et al., 2009).

4.10 Adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular e plasma

Entender as estratégias utilizadas pela *Leptospira* para adesão às células do hospedeiro é essencial para compreensão da patogênese da mesma, já que a adesão às células e matriz extracelular é crucial para a infecção e patogênese da bactéria. A partir da adesão às células do hospedeiro a bactéria pode penetrar, disseminar-se e persistir nos tecidos (EVANGELISTA;COBURN, 2010). Nosso grupo já descreveu proteínas recombinantes com a capacidade de interagir *in vitro* com componentes da matriz extracelular, Lsa24 (BARBOSA et al., 2006), Lsa21 (ATZINGEN et al., 2008), LipL53 (OLIVEIRA et al., 2010), Lsa63 (VIEIRA et al., 2010), Lsa66 (OLIVEIRA et al., 2011), Lsa33 (DOMINGOS et al., 2012), Lsa30 (SOUZA et al., 2012), OmpL1 (FERNANDES et al., 2012), Lsa44 e Lsa45 (FERNANDES et al., 2014), Lsa46 e Lsa77 (TEIXEIRA et al., 2015).

Com isso, neste trabalho avaliamos a capacidade de adesão das proteínas estudadas com componentes da matriz extracelular. Utilizamos como controle do experimento a proteína BSA, que não apresenta interação com a proteína recombinante, evidenciado pelo baixo valor de absorbância observado nas figuras a seguir.

A proteína rLIC10821 apresentou uma interação estatisticamente significativa com laminina (Figura 17). Por outro lado, a proteína rLIC10064 não apresentou interação com nenhum dos componentes testados. A interação da proteína rLIC10821 com a laminina foi confirmada por ensaio de ELISA utilizando o anticorpo monoclonal anti-His na diluição previamente titulada contra a proteína recombinante onde a absorbância foi igual a 1,0 (Figura 18).

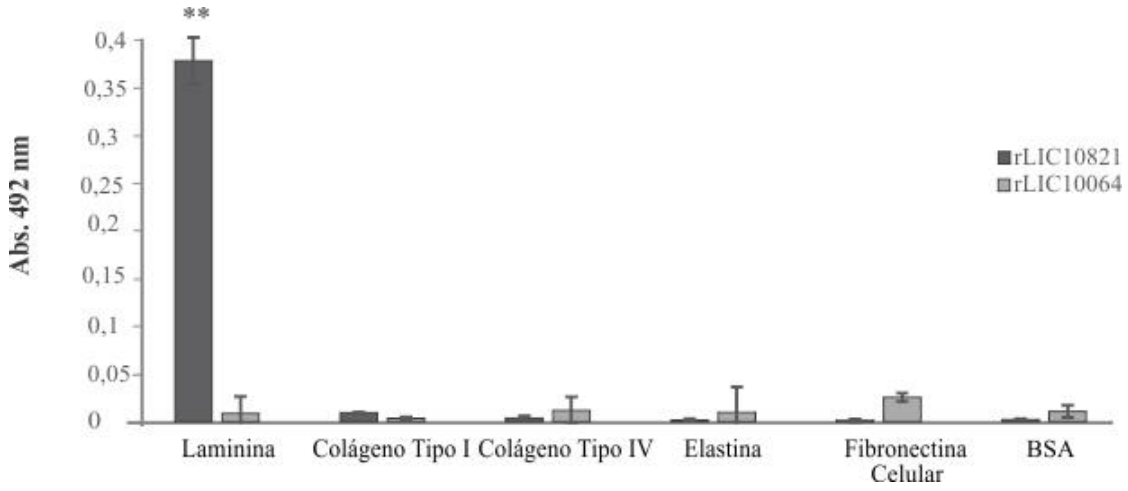

Figura 17. Avaliação da adesão das proteínas rLIC10821 e rLIC10064 com os componentes da matriz extracelular utilizando anticorpo policlonal. Foram imobilizados em placa de ELISA 1 µg de colágeno tipo I, colágeno tipo IV, Elastina, Laminina, Fibronectina celular e BSA como controle negativo. Foram adicionados 1 µg das proteínas rLIC10821 e rLIC10064 em cada poço e incubadas por 2h a 37 ºC. A detecção da ligação foi feita por anticorpo anti-rLIC10821 (1:5000), e anti-rLIC10064 (1:10000) seguido por anticorpo contra IgG de camundongo (1:5000). Os dados representam o valor da média ± desvio padrão da triplicata. Para análise estatistica, a ligação da proteína a cada componente foi comparada com o controle negativo BSA por teste t-Student (**p<0,01)

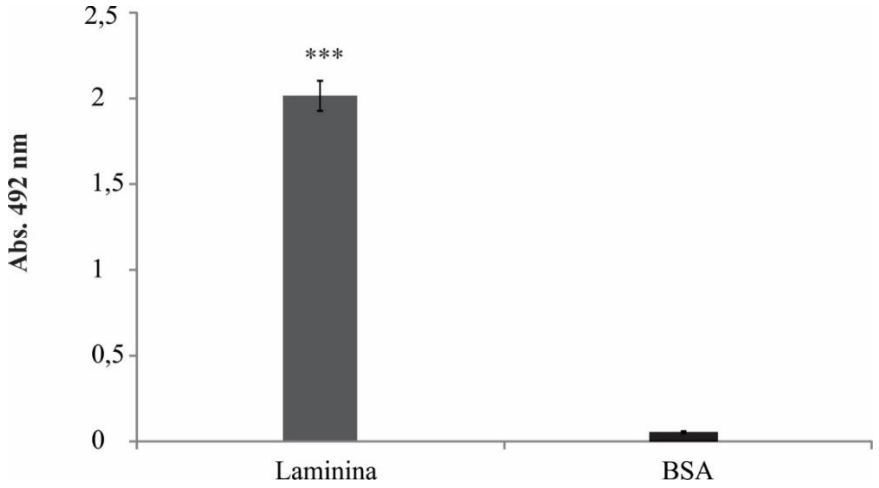

Figura 18. Avaliação da adesão da proteína rLIC10821 a laminina utilizando anticorpo monoclonal anti-his. Em placa de ELISA, foram imobilizados 1 µg de Laminina e BSA (controle negativo). Foi adicionado 1 µg de proteína rLIC10821 em cada poço e incubada por 2h a 37 ºC. Para determinar se ligação era especifica da proteina recombinante com o componente laminina, utilizamos o anticorpo monoclonal contra a repetição de 6 histidinas (anti-his) presente da proteína recombinante na diluição de 1:5000. Os resultados representam o valor da média ± o desvio padrão da triplicata. Para análise estatistica, a ligação da proteína a laminina foi comparada com a ligação com o controle negativo BSA pelo teste t-Student (***p<0,001)

Além da interação com os componentes da matriz extracelular, avaliamos a interação das proteínas com componentes do plasma. Já foram descritos para outros patógenos e inclusive na *Leptospira*, sua capacidade de capturar o plasminogênio do soro do hospedeiro, e convertê-lo em plasmina utilizando os ativadores também do hospedeiro (VIEIRA et al., 2009). Com isso a leptospira dispõe de um grande poder de invasão, degradando componentes de matriz extracelular e efetores imunes (VIEIRA et al., 2011).

A proteína rLIC10821 foi capaz de interagir com o plasminogênio e com o fibrinogênio de forma estatisticamente significativa (Figura 19). Assim como para a laminina, confirmamos a interação da proteína recombinante rLIC10821 com os componentes do plasma PLG e Fg por ELISA, utilizando o anticorpo monoclonal anti-His (Figura 20).

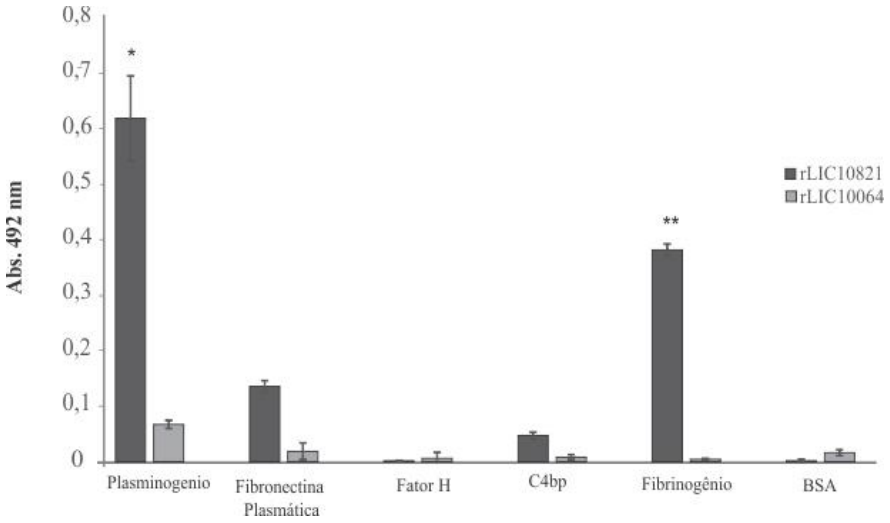

Figura 19. Avaliação da interação das proteínas rLIC10821 e rLIC10064 com componentes do plasma empregando o soro policlonal anti-rLIC10821. Em placa de ELISA foram imbolizados 1 µg de plasminogênio, fibronectina plasmática, fator H, C4bp, Fibrinogênio e BSA, utilizado como controle negativo, por poço. Então, foi adicionado 1 µg da proteína rLIC10821 e da proteína rLIC10064 e incubados por 2h a 37 ºC. A detecção da interação foi realizada utilizando anticorpo policlonal anti-rLIC10821 (1:5000) anti-rLIC10064 (1:10000) produzidos em camundongo, e anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Os resultados representam o valor da média ± o desvio padrão da triplicata. Para análise estatistica, a ligação da proteína aos componentes foi comparada com a ligação com o controle negativo BSA pelo teste t-Student (*p<0,1, **p<0,01).

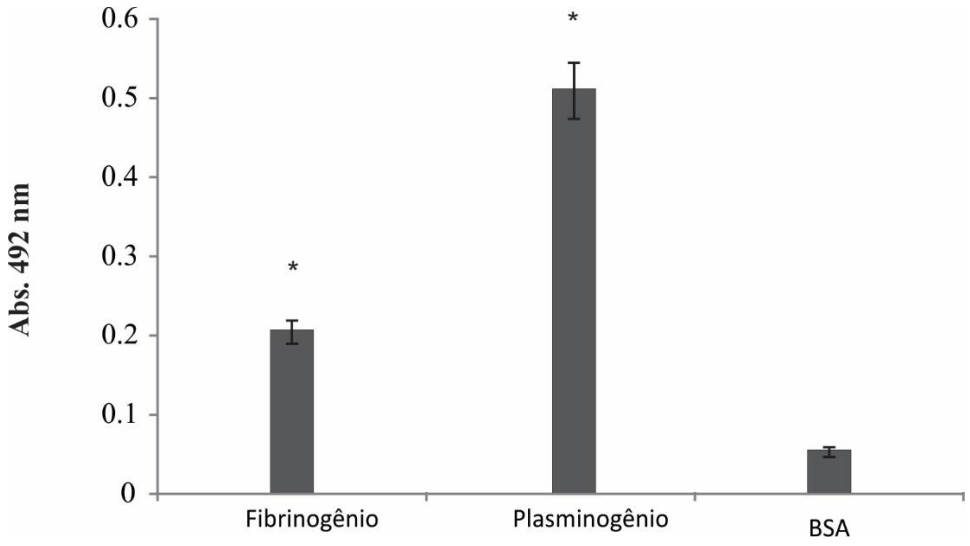

Figura 20. Avaliação da interação da proteína rLIC10821 os componentes do plasma utilizando anticorpo monoclonal anti-his. Em placa de ELISA, foram imobilizados 1 µg de fibrinogênio, plasminogênio e BSA (controle negativo) por poço. Foi adicionado 1 µg de proteína rLIC10821 em cada poço e incubada por 2h a 37 ºC. Para determinar se ligação era especifica da proteina recombinante com os componentes fibrinogênio e plasminogênio, utilizamos o anticorpo monoclonal contra a repetição de 6 histidinas (anti-his) presente da proteína recombinante na diluição de 1:5000. Os resultados representam o valor da média ± o desvio padrão da triplicata. Para análise estatistica, a ligação da proteína a laminina foi comparada com a ligação com o controle negativo BSA pelo teste t-Student (*p<0,1)

Além disso, foi feito um ensaio onde podemos observar se houve uma inibição da ligação da proteína recombinante com o componente, após a incubação da proteína recombinante com seu respectivo antissoro. O anticorpo apresentou uma capacidade de inibição estatisticamente significativa, em torno de 20% quando comparado com a proteína que não teve incubação prévia para a laminina, cerca de 50% para o plasminogêmio e 80% para o fibrinogênio. Como controle, as proteínas também foram incubadas com soro pré-imune, nas mesmas concentrações empregadas para o soro anti-proteína, Figuras 21 e 22.

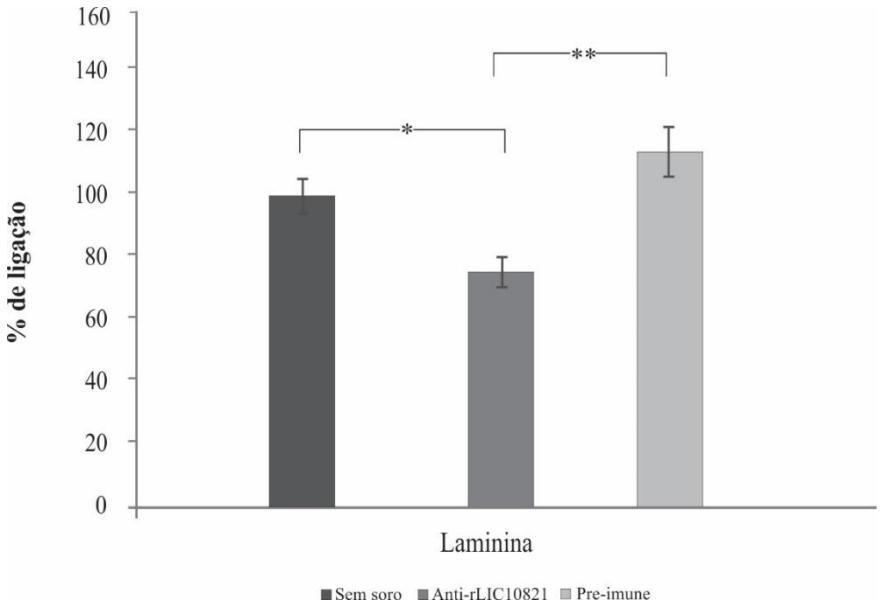

Figura 21. Avaliação da interferência do antisoro na interação da proteína recombinante com laminina. Em placa de ELISA foram imobilizados 1 µg de laminina por poço. Então foram adicionados 1 µg de proteína rLIC10821, previamente incubado com o antissoro (anti rLIC10821), ou (anti-PBS) ou sem adição de anticorpo (sem soro), em seus respectivos poços. Após a incubação, o antissoro foi sondado utilizando o anticorpo anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Para análise estatistica, foi feita comparação das médias dos grupos por ANOVA, seguido de pós teste de Tukey (*p<0,1, **p<0,01).

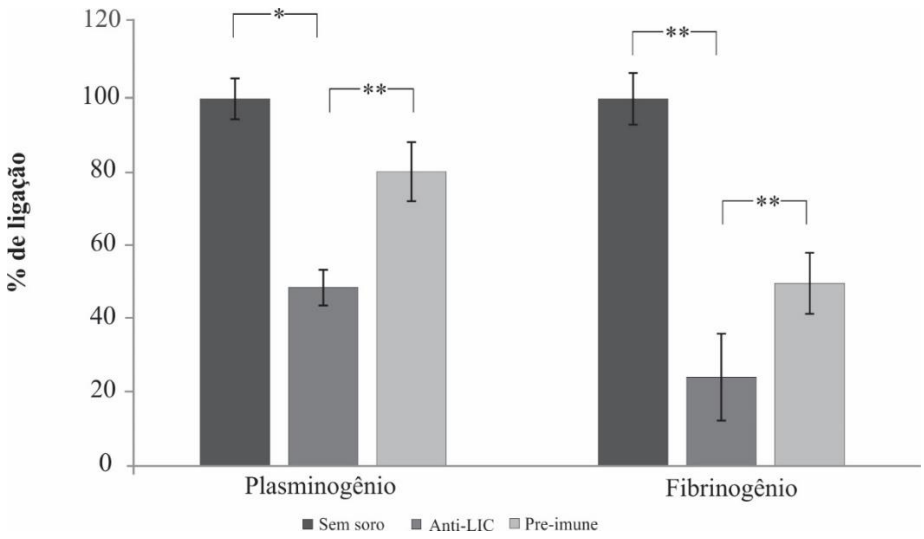

Figura 22. Avaliação da interferência do antissoro na interação da proteína recombinante com plasminogênio e fibrinogênio. Em placa de ELISA foram imobilizados 1 µg de cada componente por poço. Então foram adicionados 1 µg de proteína rLIC10821, previamente incubado com o antissoro (anti-rLIC10821), ou (anti-PBS) ou sem adição de anticorpo (sem soro), em seus respectivos poços. Após a incubação, o antissoro foi sondado utilizando o anticorpo ant-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Para análise estatistica, foi feita comparação das médias dos grupos por ANOVA, seguido de pós teste de Tukey (*p<0,1, **p<0,01).

4.11 Curva de dose resposta

Os ensaios de dose-resposta foram utilizados para definir a afinidade da ligação das proteínas recombinantes aos componentes, nos quais os componentes de matriz extracelular ou plasma foram incubados com concentrações crescentes da proteína recombinante.

Foi possível observar que a proteína rLIC10821 possui uma ligação dose-dependente e saturável com o plasminogênio (Figura 23), e uma ligação dose-dependente não saturável, nas concentrações testadas, com os componentes laminina (Figura 24) e fibrinogênio (Figura 25).

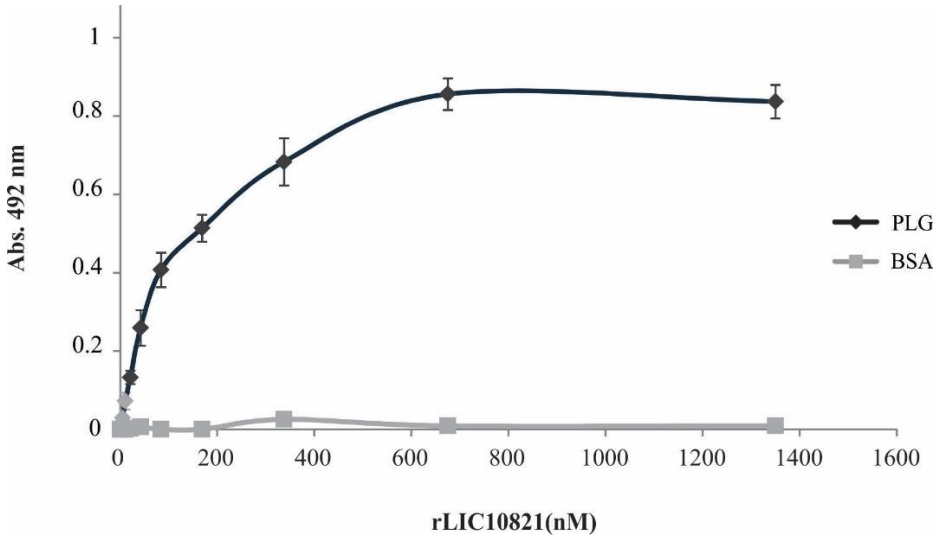

Figura 23.Ensaio de dose dependência da reação da rLIC10821 com o plasminogênio. Em placa de ELISA foi imobilizado 1 µg de plasminogênio por poço. Então, foram adicionadas concentrações crescentes da proteína rLIC10821 e realizamos uma diluição seriada. Após a incubação da proteína com o componente por 2h a 37 ºC , foi adicionado o antissoro contra a proteína recombinante rLIC10821 e o anticorpo contra a IgG de camundongo conjugado com peroxidase. O K_D calculado entre os dois componentes foi de110,2 ± 22,4 nM.

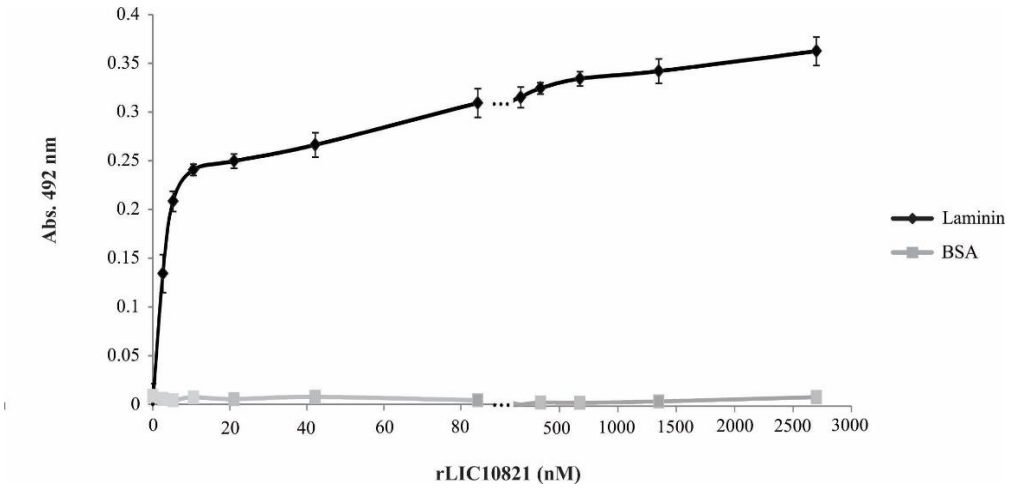

Figura 24. Ensaio de dose dependênciada reação da rLIC10821 com a laminina. Em placa de ELISA foi imobilizado 1 µg de laminina por poço. Então, foram adicionadas concentrações crescentes da proteína rLIC10821 e realizamos uma diluição seriada. Após a incubação da proteína com o componente por 2h a 37 ºC, foi adicionado o antissoro contra a proteína recombinante rLIC10821 e o anticorpo contra a IgG de camundongo conjugado com peroxidase.

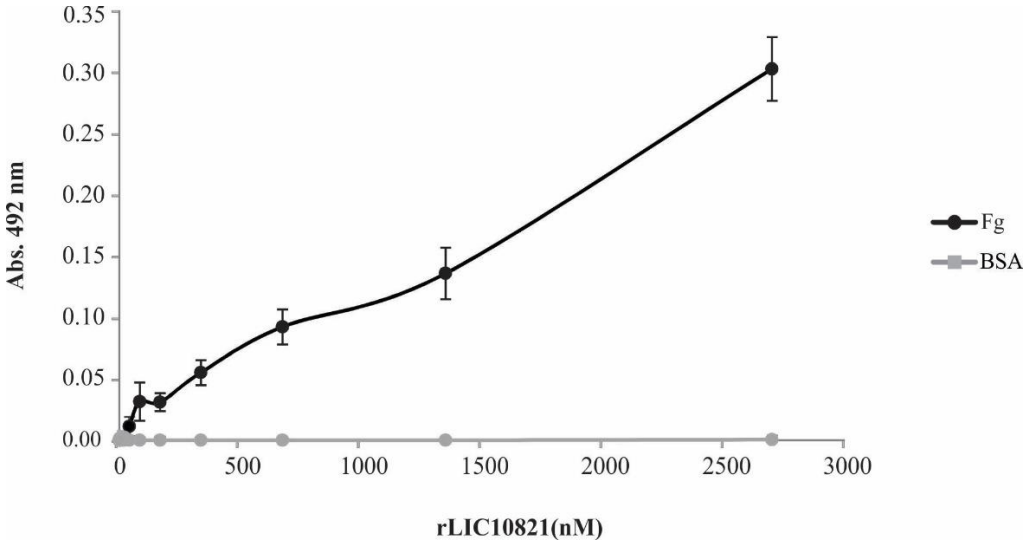

Figura 25.Ensaio de dose dependência da reação da rLIC10821 com ofibrinogênio. Em placa de ELISA foi imobilizado 1 µg de fibrinogênio por poço. Então, foram adicionadas concentrações crescentes da proteína rLIC10821 e realizamos uma diluição seriada. Após a incubação da proteína com o componente por 2h a 37 ºC, foi adicionado o antissoro contra a proteína recombinante rLIC10821 e o anticorpo contra a IgG de camundongo conjugado com peroxidase.

A proteína rLIC10821 possui uma alta afinidade ao PLG, evidenciada pelo baixo valor da constante de dissociação (K_D) de 110,2 ± 22,4 nM, na mesma ordem de magnitude de outras

proteínas já descritas na literatura (CARVALHO et al., 2009; FERNANDES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2011; STEVENSON et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2015). Não foi possível calcular a constante de dissociação da proteína rLIC10821 em relação ao fibrinogênio e a laminina pois a saturação da interação não foi atingida.

4.14 Caracterização da ligação da rLIC10821 com plasminogênio

Já é descrito na literatura que os domínios *kringle* presentes no plasminogênio interagem com os resíduos de lisinas em receptores de uma ampla gama de bactérias (LÄHTEENMÄKI; KUKKONEN; KORHONEN, 2001; LAHTEENMAKI; KUUSELA; KORHONEN, 2001). Assim como estas bactérias, as leptospiras também possuem a característica de interagir com o plasminogênio via domínios *kringle*, visto que utilizando-se de um análogo de lisina, ácido aminocapróico (ACA), foi possível observar a inibição da ligação entre a bactéria e o plasminogênio. A partir destes dados, fomos avaliar a participação dos resíduos de lisina na ligação entre a proteína recombinante e o plasminogênio.

Ao adicionar concentrações crescentes de ACA foi possível observar a diminuição da interação da proteína recombinante com o plasminogênio, sugerindo que a ligação entre estes se dá via domínios *kringle* e os resíduos de lisina presentes na proteína. Analisamos estatisticamente, com teste *t-Student*, a ligação na ausência de ACA, com os outros tratamentos com acréscimo gradual da concentração do competidor (Figura 26).

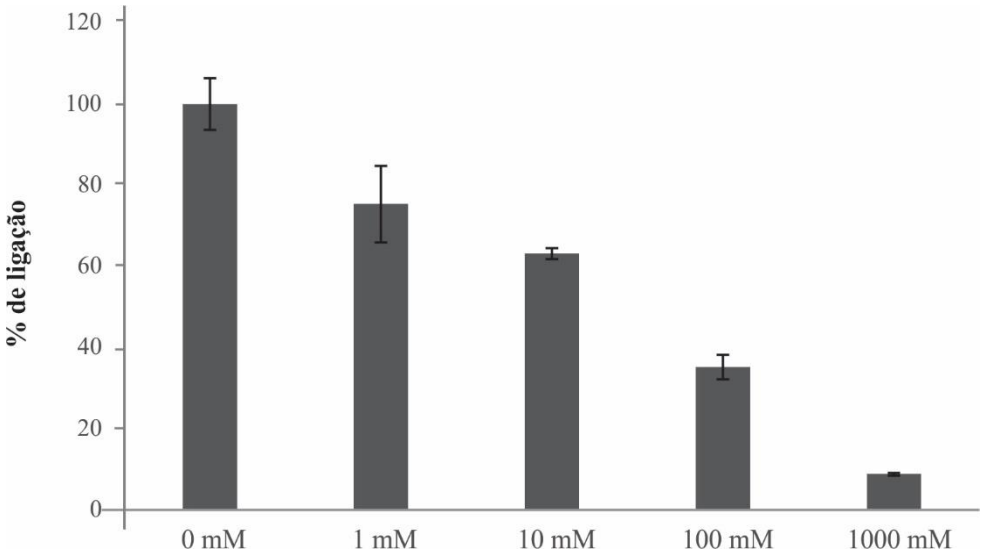

Figura 26. Caracterização da ligação da proteína rLIC10821 com o plasminogênio. Em placa de ELISA foi imobilizado 1 µg de plasminogênio por poço. Então foi adicionada proteína rLIC10821 para interação com o componente, esta interação foi sondada utilizando o antissoro anti-rLIC10821, que por sua vez foi detectado utilizando-se o anticorpo contra IgG de camundongo conjugado com peroxidase.

4.12 Conversão de plasminogênio a plasmina

Como descrito anteriormente, a *Leptospira* é capaz de capturar o plasminogênio presente no soro do hospedeiro, utilizando diversas proteínas descritas, ligantes de plasminogênio entre outros componentes, e transforma-lo em sua forma ativa plasmina, utilizando-se do ativador do hospedeiro, uroquinase (VIEIRA et al., 2009). A plasmina é uma serino protease de amplo espectro capaz de degradar diversos componentes da matriz extracelular, como laminina e colágeno tipo IV, e também é capaz de degradar imunoglobulinas (VIEIRA et al., 2011). Tal capacidade promove uma grande invasividade e evasão imune para esta bactéria.

Com isso, nós realizamos um ensaio onde avaliamos se a proteína recombinante após incubação com o plasminogênio, é capaz de transformá-lo em plasmina, na presença do ativador uPA e assim degradar um substrato cromogênico específico. Utilizamos como controle a proteína BSA, e diversos tratamentos onde ocultamos um dos componentes que engloba o sistema.

Foi possível observar que o plasminogênio que estava ligado à proteína rLIC10821 foi capaz de ser convertido em plasmina e degradar o substrato cromogênico, apenas na presença do ativador uPA, figura 27. A proteína rLIC10064 foi utilizada nesse experimento como controle negativo, reforçando sua falta de interação com o componente do plasma PLG.

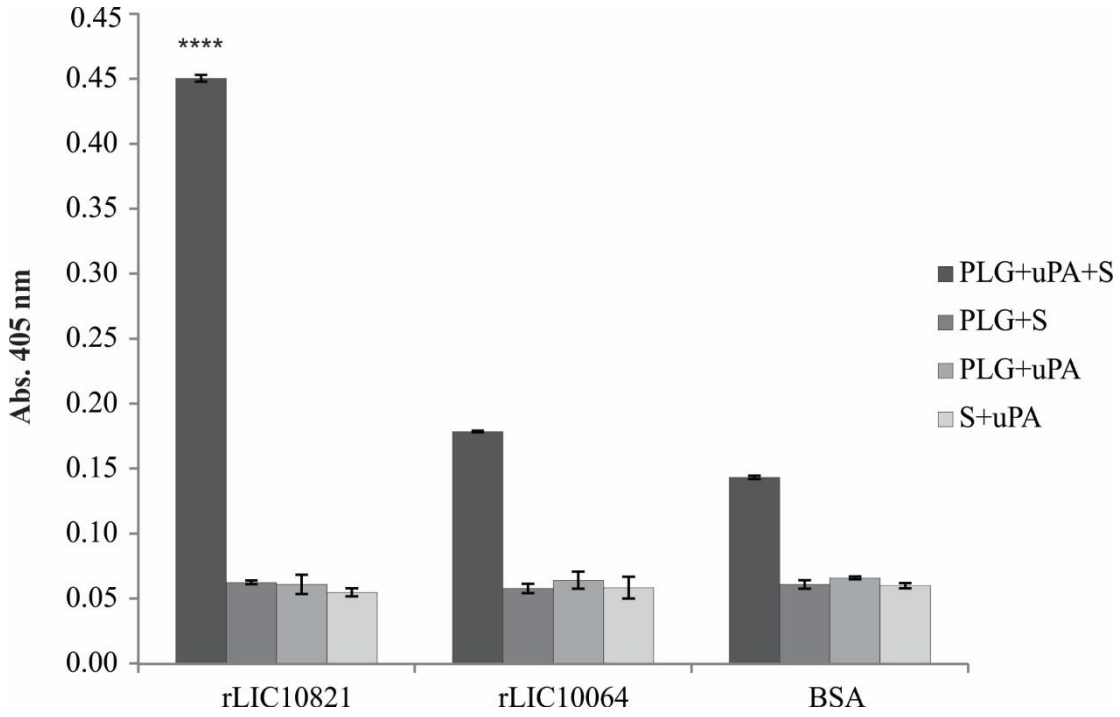

Figura 27. Ensaio de conversão de plasminogênio em plasmina. Em placa de ELISA foi imobilizado 1 µg de cada proteína recombinante por poço. As proteínas foram incubadas com 1 µg por poço de plasminogênio (PLG) durante 2h a 37 ºC. Após a interação da proteína com o componente, foram adicionados o ativador plasminogênio (uPA) e um subrastrato cromogênico específico para plasmina (S). Exceto no primeiro tratamento (PLG+uPA +S), retiramos um dos componentes para ser feito o controle negativo do experimento. Para análise estatística, a ligação da proteína aos componentes foi comparada com a ligação com o controle negativo pelo teste t-Student (***p<0,001).

4.13 Inibição do coágulo de fibrina

A leptospirose apresenta diversos sintomas, muitos são facilmente confundidos com uma gripe comum, porém nos casos mais severos podemos observar quadros hemorrágicos que podem levar o paciente ao óbito (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Uma possível explicação seria que as leptospiras se ligariam ao fibrinogênio, dificultando ou impedindo a formação do coágulo de fibrina. Já foram descritas algumas proteínas capazes de se ligar ao fibrinogênio (CHOY et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2013; PINNE; CHOY; HAAKE, 2010) e algumas proteínas de superfície são capazes diminuir a formação do coágulo de fibrina (LIN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013). A redução da formação do coágulo de fibrina também está relacionada com o processo de disseminação de patógenos (HOUSTON et al., 2012).

Como nós observamos que a proteína rLIC10821 é capaz de se ligar ao fibrinogênio, realizamos um ensaio para observar a capacidade desta proteína em interferir na formação do coágulo de fibrina.

A proteína rLIC10821 foi capaz de reduzir a formação do coágulo de fibrina de forma significativa quando comparada com o controle positivo, onde não houve nenhuma interferência na formação do coágulo. A interferência foi dose-dependente sendo possível observar uma diminuição de até 60% na concentração máxima testada (Figura 28).

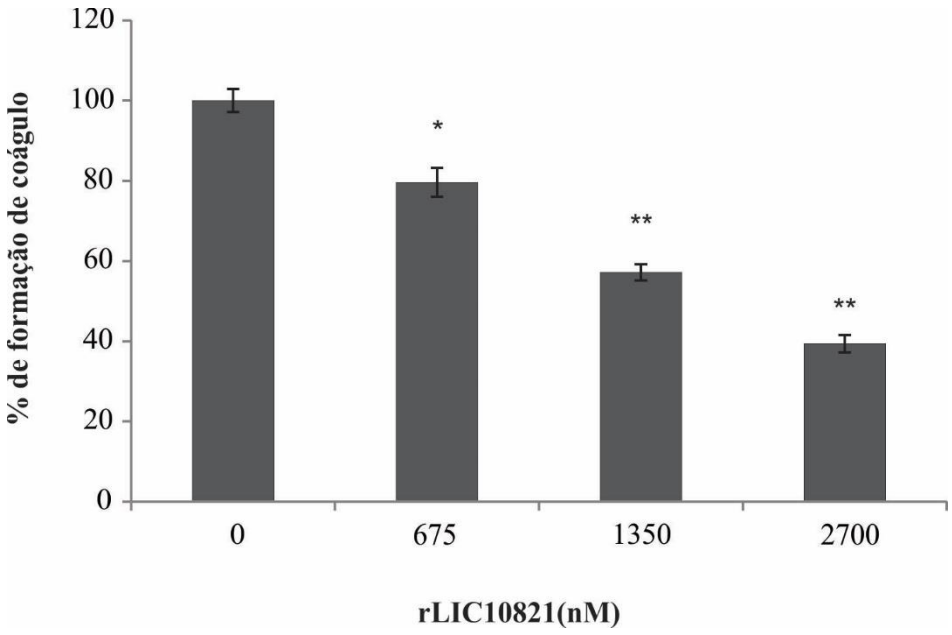

Figura 28. Ensaio de Inibição do coágulo de fibrina. Em uma placa de 96 poços, foi colocado 10 µLde uma solução 10 U/mL de fibrina, e completada com 90 µL de uma solução contendo fibrinogênio (1 µg/µL) previamente incubado com a proteína rLIC10821 a 37 ºC por 2 horas. Controle positivo, contém apenas a fibrina com o fibrinogênio, ou seja, ausente da interferência da proteína recombinante, e foi considerado como a máxima formação de coágulo neste experimento, com isso os valores de absorbância foram convertidos em porcentagem. Para análise estatística, a ligação da proteína aos componentes foi comparada com a ligação com o controle positivo pelo teste t-Student (*p<0,1 e **p<0,01).

5 CONCLUSÃO

Podemos observar que as proteínasrLIC10821 e rLIC10064 são conservadas em diversas espécies de *Leptospira* spp. Os genes foram clonados, e suas respectivas proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS (rLIC10821) na forma insolúvel em corpúsculo de inclusão e BL21 SI (rLIC10064) na forma solúvel.

Confirmando a predição obtida *in silico*, podemos sugerir a presença da proteína rLIC10821 na membrana externa da bactéria, utilizando-se de 3 metodologias distintas. Apesar da predição da proteína rLIC10064 indicá-la como uma proteína periplasmática, também podemos observar sua presença na membrana externa.

As proteínas foram capazes de induzir uma resposta humoral em modelo animal. A proteína rLIC10821 foi capaz de interagir com o componente de matriz extracelular laminina e com os componentes plasminogênio e fibrinogênio do plasma e tais interações foram caracterizadas. Com isso, sugerimos que esta proteína pode estar envolvida no processo de colonização e invasão de diversas espécies de *Leptospira* spp. O fato da proteína rLIC10821 ser capaz de interagir com o fibrinogênio e inibir a formação do coágulo, sugere o envolvimento desta proteína em casos hemorrágicos de leptospirose, favorecendo a disseminação da bactéria nas fases iniciais.

A proteína rLIC10064 apesar de possuir mais cópias por célula, foi menos reativa a soros de pacientes humanos quando comparada com a proteína rLIC10821.

A *Leptospira* possui um vasto repertório de proteínas com a capacidade de adesão que provavelmente estão envolvidas na patogênese da bactéria. Apesar da proteína rLIC10064 não ter função de adesina, a proteína foi encontrada na membrana externa da bactéria, e além de ser bem conservada em diversas cepas e espécies, ela foi encontrada na cepa virulenta, sugerindo sua presença durante a infecção.

REFERÊNCIAS*

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

AHMED, N. et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.,** v. 5, p. 28, 2006.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.,** v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ATZINGEN, M. V. et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol.,** v. 8, p. 70, 2008.

_____. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. **J. Infect.,** v. 59, n. 4, p. 264-276, 2009.

BABER, M. D.; STUART, R. D. Leptospirosis canicola; a case treated with penicillin. **Lancet,** v. 2, n. 6426, p. 594-596, 1946.

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

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

BHANDARI, P.; GOWRISHANKAR, J. An Escherichia coli host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. **J. Bacteriol.,** v. 179, n. 13, p. 4403-6, Jul 1997. ISSN 0021-9193.

BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.,** v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BOON HINCKLEY, M. et al. A Leptospira interrogans enzyme with similarity to yeast Ste14p that methylates the 1-phosphate group of lipid A. **J. Biol. Chem.,** v. 280, n. 34, p. 30214-30224, 2005.

BRAMEL, R. G.; SCHEIDY, S. F. The effect of revaccination of horses and cattle with Leptospira pomona bacterin. **J. Am. Vet. Med. Assoc.,** v. 128, n. 8, p. 399-400, 1956.

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

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

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

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

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

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

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

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

CHOY, H. A. et al. Physiological osmotic induction of Leptospira interrogans adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infect. Immun.,** 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.

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

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

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

D'ANDREA, A. et al. Comparison of two PCR methods for detection of Leptospira interrogans in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 107, n. 1, p. 85-8, Feb 2012. ISSN 1678-8060.

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.

DUNCAN, G. et al. The influence of protein solubilisation, conformation and size on the burst release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres. **J. Control Release,** v. 110, n. 1, p. 34-48, 2005.

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

FAINE, S., editors et al.. **Leptospira and Leptospirosis**. Melbourne, Australia, MediScied; 1999.

FERNANDES, L. G. et al. Functional and immunological evaluation of two novel proteins of Leptospira spp. **Microbiology**, 2014.

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

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

GAZI, I. F. et al. Leptospirosis is associated with markedly increased triglycerides and small dense low-density lipoprotein and decreased high-density lipoprotein. **Lipids,** v. 46, n. 10, p. 953-960, 2011.

GRIFFITH, M. E.; HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K. Antimicrobial therapy of leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.,** v. 19, n. 6, p. 533-537, 2006.

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

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology,** v. 146 (Pt 7), p. 1491-1504, 2000.

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

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

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

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

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

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.

HOOKEY, J. V. Detection of Leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 69, n. 3, p. 267-274, 1992.

HOUSTON, S. et al. Activation and proteolytic activity of the Treponema pallidum metalloprotease, pallilysin. **PLoS Pathog.,** v. 8, n. 7, p. e1002822, 2012.

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

JENKINS, J.; MAYANS, O.; PICKERSGILL, R. Structure and evolution of parallel beta-helix proteins. **J. Struct. Biol.,** v. 122, n. 1-2, p. 236-46, 1998. ISSN 1047-8477.

JOHNSON, R. C.; ROGERS, P. 5-Fluorouracil as a Selective Agent for Growth of Leptospirae. **J. Bacteriol.,** v. 87, p. 422-426, 1964.

JOHNSON, W. C. Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. **Proteins,** v. 7, n. 3, p. 205-214, 1990.

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

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

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

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

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

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.

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

LANGSTON, C. E.; HEUTER, K. J. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. **Vet. Clin. North Am. SmallAnim. 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.

LAURICHESSE, H. et al. Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae in healthy volunteers. **Clin. Microbiol. Infect.,** v. 13, n. 4, p. 395-403, 2007.

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

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

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

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

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

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

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

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.

MAROTTO, P. C. et al. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. **Clin. Infect. Dis.,** v. 29, n. 6, p. 1561-1563, 1999.

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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

PARK, S. K. et al. Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: a study of 93 patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 41, n. 3, p. 345-351, 1989.

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

PEROLAT, P. et al. Leptospira fainei sp. nov., isolated from pigs in Australia. **Int. J. Syst. Bacteriol.,** v. 48 Pt 3, p. 851-858, 1998.

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.

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

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

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.

REITSTETTER, R. E. Development of species-specific PCR primer sets for the detection of Leptospira. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 264, n. 1, p. 31-39, 2006.

REN, S. X. et al. Unique physiological and pathogenic features of Leptospira interrogans revealed by whole-genome sequencing. **Nature,** v. 422, n. 6934, p. 888-893, 2003.

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.

ROMERO, E. C.; YASUDA, P. H. Molecular characterization of Leptospira sp. strains isolated from human subjects in Sao Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 101, n. 4, p. 373-378, 2006.

SAKATA, E. E. et al. [The serovars of Leptospira interrogans isolated from cases of human leptospirosis in Sao Paulo, Brazil]. **Rev. Inst. Med Trop. Sao Paulo,** v. 34, n. 3, p. 217-221, 1992.

SARKAR, J. et al. Leptospirosis: a re-emerging infection. **Asian Pac. J. Trop. Med.,** v. 5, n. 6, p. 500-502, 2012.

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

SEGURA, E. R. et al. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. **Clin. Infect. Dis.,** v. 40, n. 3, p. 343-351, 2005.

SEHGAL, S. C. Leptospirosis on the horizon. **Natl. Med. J. India,** v. 13, n. 5, p. 228-230, 2000.

SOUZA, N. M. et al. Lsa30, a novel adhesin of Leptospira interrogans binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. **Microb. Pathog.,** v. 53, n. 3-4, p. 125-134, 2012.

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

STUDIER, F. W. et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymol.,** v. 185, p. 60-89, 1990. ISSN 0076-6879.

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

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

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

TOYOKAWA, T.; OHNISHI, M.; KOIZUMI, N. Diagnosis of acute leptospirosis. **Expert Rev. Anti Infect Ther.,** v. 9, n. 1, p. 111-121, 2011.

TREVEJO, R. T. et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. **J. Infect. Dis.,** v. 178, n. 5, p. 1457-1463, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WATT, K. et al. Induced alpha-helix structure in the aryl hydrocarbon receptor transactivation domain modulates protein-protein interactions. **Biochemistry,** v. 44, n. 2, p. 734-743, 2005.

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.

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.

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

YERSIN, C. et al. Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,** v. 94, n. 1, p. 71-76, 2000.

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.