Aline Rodrigues Florêncio Teixeira

**Avaliação e Caracterização de Candidatos Vacinais
Voltados para o Controle da Leptospirose**

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

São Paulo
2016

Aline Rodrigues Florêncio Teixeira

**Avaliação e Caracterização de Candidatos Vacinais
Voltados para o Controle da Leptospirose**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento

Versão original

São Paulo
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

Teixeira, Aline Rodrigues Florêncio.

Avaliação e caracterização de candidatos vacinais voltados para o controle da leptospirose / Aline Rodrigues Florêncio Teixeira. -- São Paulo, 2016.

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

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

Versão do título para o inglês: Evaluation and characterization of vaccine candidates against leptospirosis.

1. Leptospira 2. Leptospirose 3. Proteínas recombinantes 4. Patogenicidade 5. Vacina I. Nascimento, Profa. Dra. Ana Lucia Tabet Oller do II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB011/2016

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

Candidato(a): Aline Rodrigues Florêncio Teixeira.

Título da Tese: Avaliação e caracterização de candidatos vacinais voltados para o controle da leptospirose.

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

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação e caracterização de candidatos vacinais voltados para o controle da leptospirose", **protocolo n° 890/12**, sob a responsabilidade de Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento e Aline Rodrigues Florêncio Teixeira – 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 n° 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 11/4/12.

We certify that the research entitled "Evaluation and characterization of vaccine candidates against leptospirosis", **protocol number 890/12**, under the responsibility of Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento and Aline Rodrigues Florêncio Teixeira – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research – is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 11/4/12.

Vigência do Projeto: 04/2012 - 02/2016 Centro de Biotecnologia	N° de animais/espécie 175 camundongos Balb/c (F); 40 hamsters (F)
---	--

São Paulo, 23 de abril de 2012

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

*Aos meus amados pais,
Azinete e Francisco*

*Às minhas queridas irmãs,
Andréia e Ana Paula*

*Ao Fernando,
meu companheiro*

*Uma pequena dedicatória
a pessoas de enorme importância*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento, minha orientadora, pela oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional, pela confiança depositada, por toda ajuda e paciência, pela grande contribuição ao desenvolvimento desse trabalho, e por sua dedicação a pesquisa, sem dúvida é uma profissional de grande exemplo.

Meus sinceros agradecimentos!

À família que me foi concedida nessa vida. Francisco meu pai, Azinete minha mãe, Andréia e Ana Paula minhas irmãs. Agradeço por todo apoio e amor incondicional.

Ao meu amor Fernando, por toda paciência e compreensão durante o desenvolvimento desse trabalho. Com certeza seu apoio foi fundamental.

À família adquirida. Fernando meu sogro, Luzia minha sogra, Renato, Ricardo, Gleice e Rodrigo meus cunhados, Felipe e Gustavo meus lindos sobrinhos, Tica e Teka minhas filhas de 4 patas. Agradeço por toda ajuda, carinho e momentos de descontração.

Ao Luís Guilherme, por ser uma pessoa brilhante e me receber tão bem no laboratório, por sua enorme vontade de sempre ajudar, pelas conversas científicas, pela grande colaboração nos ensaios de desafio. Agradeço por toda ajuda e amizade.

Aos amigos do laboratório. Priscila, Jupciana, Raquel, Mônica, Lucas, Jadson, Maria Fernanda, Amanda, Leandro e Fernanda. Em especial agradeço a Gabi Hase, pelas discussões científicas e pessoais. Agradeço por proporcionarem um ambiente de trabalho alegre e prazeroso.

Aos amigos que já passaram pelo laboratório. Rosane, Renan, Marina, Marília e Ivy. Em especial agradeço a Natalie Souza.

À equipe do prof. Dr Silvio Vasconcellos do Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da USP. Em especial agradeço a Zenaide Moraes e Gisele Souza pelo excelente trabalho desenvolvido, pela grande colaboração nos experimentos com animais e manutenção das culturas de leptospiros.

À Dra. Eliete Romero do Instituto Adolfo Lutz e a Dra. Karin Kirchgatter do IMT pelos soros cedidos.

Ao Henrique Krambeck Roffato do Departamento de Parasitologia do Instituto Butantan, pelo auxílio no uso do microscópio confocal.

Aos professores das disciplinas que tive o prazer de participar. Agradeço pela grande contribuição na minha formação.

Aos amigos formados durante a disciplina de imunologia. Andrews Krupinski, Thiago Oliveira, Katie Riciluca, Thalita Araujo, Marcela Bordenalli, Bruno Yamamoto, Giovana Salustiano e Ivana Campos, simplesmente por serem pessoas fantásticas.

Aos amigos que me acompanham desde o mestrado. Dani da Luz, Roberto Nepomuceno, Carolina Rívilas, Karine Guimarães, Débora Santos, Priscila Dal Pozo e Loren Cristina. Agradeço por todas as conversas e momentos de descontração.

À Keyde Cristina, por ser uma pessoa alegre e divertida. Agradeço pelas conversas científicas e pessoais.

Aos amigos Mateus Luchese e Érika Kavati, pelas boas conversas, às vezes breve durante a hora do almoço, mas sempre de muito proveito.

Ao Giovane, Rosa e Marisa do biotério do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, por cuidarem zelosamente dos animais.

Aos secretários da Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia. Marco, Fábía e Eliane. As secretárias do Departamento do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, Fatima e Darlene. Agradeço por toda ajuda direta ou indireta.

À Graça, Sueli e Marisa pela manutenção do laboratório.

A todos do Instituto Butantan, em especial ao Centro de Biotecnologia.

Aos funcionários do serviço de Biblioteca do ICB, por trabalharem de forma eficiente, por serem sempre gentis informando o necessário.

Ao apoio financeiro da FAPESP, CNPQ e fundação Butantan, pelo auxílio à pesquisa, possibilitando a realização desse trabalho.

*A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização
desse trabalho.*

*Acima de tudo agradeço a **Deus** por ser minha fonte de inspiração.*

*Aos seres de luz por toda energia circulante, que com certeza,
favoreceu a realização desse trabalho. Enfim, agradeço por todo
direcionamento dado nessa trajetória da minha vida.*

Muito Obrigada!

*"Todos os acontecimentos
são ótimas oportunidades
para a evolução."*

Masaharu Taniguchi

RESUMO

TEIXEIRA, A. R. F. **Avaliação e caracterização de candidatos vacinais voltados para o controle da leptospirose.** 2016. 191 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A leptospirose é uma doença sistêmica, causada por bactérias do gênero *Leptospira*. A doença é considerada uma importante zoonose mundial por representar um enorme problema de saúde pública. Acredita-se que mais de um milhão de novas infecções por ano possam acontecer, resultando em aproximadamente 60 mil mortes. No Brasil, surtos ocorrem principalmente durante os períodos chuvosos em áreas metropolitanas que apresentam infraestrutura inadequada, o que favorece a proliferação de roedores que são os principais reservatórios da doença. Medidas para o controle da leptospirose são difíceis de serem executadas. Assim, o desenvolvimento de novas estratégias para prevenir e controlar a disseminação da doença é necessário. Vacinas profiláticas ou imunoterapêuticas surgem como fortes candidatas para contornar o problema. Nesse sentido, as pesquisas atuais têm interesse em identificar antígenos conservados que estão envolvidos nas interações patógeno-hospedeiro. Considerando esses requisitos como sendo essenciais para o desenvolvimento de uma vacina, o presente projeto selecionou três proteínas hipotéticas (LIC13479, LIC10050 e LIC10537) de *L. interrogans* para serem caracterizadas quanto ao seu papel na patogênese e avaliadas quanto ao seu potencial protetor após desafio com uma cepa virulenta. Os genes foram selecionados com base na sua localização celular predita e amplificados por PCR utilizando o DNA da *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Os fragmentos de DNA gerados foram clonados no vetor de expressão PAE e expressos em *Escherichia coli*. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade ao metal e a presença de estrutura secundária foi avaliada por dicróismo circular. Análises *in silico* das sequências codificadoras mostraram que essas proteínas são conservadas em diferentes espécies e sorovares de leptospiros. Ensaios de localização celular demonstraram a exposição das proteínas na superfície das bactérias, o que corrobora com as análises *in silico*. As proteínas recombinantes foram reconhecidas por soro de indivíduos infectados, sugerindo que são expressas durante a infecção. Ensaios de adesão com componentes da matriz extracelular mostraram que as proteínas rLIC13479 e rLIC10050 foram capazes de se ligar a laminina de maneira dose-dependente e saturável, e por isso foram nomeadas Lsa46 e Lsa77 (Leptospiral Surface Adhesin, seguido de suas respectivas massas moleculares), respectivamente. Ambas as proteínas também foram capazes de se ligar ao plasminogênio (PLG) e a fibronectina plasmática. Em relação à LIC10537, dois fragmentos recombinantes foram gerados, que corresponde a porção N-terminal (fragmento 1) e C-terminal (fragmento 2) da proteína. Apenas o fragmento 2 foi capaz de interagir com PLG de maneira dose-dependente. Todas as proteínas que interagiram com o PLG foram capazes de gerar plasmina, indicando que essas proteínas podem contribuir durante a invasão das bactérias no hospedeiro. Avaliação da atividade imunogênica realizada em camundongos com as proteínas recombinantes mostrou que todas as proteínas foram capazes de estimular uma resposta imune. Ao analisar o perfil de citocinas geradas no sobrenadante de células em cultivo, a maioria das formulações testadas foi capaz de produzir um padrão misto de resposta *Th1/Th2*. As proteínas recombinantes Lsa46 e Lsa77 exerceram proteção parcial no modelo de leptospirose em hamsters após desafio letal com as bactérias. Os dados observados mostram que as proteínas são expressas durante a infecção e podem ter um papel na patogênese da *Leptospira*.

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

ABSTRACT

TEIXEIRA, A. R. F. **Evaluation and characterization of vaccine candidates against leptospirosis.** 2016. 191 p.Ph.D thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Leptospirosis is a systemic disease caused by pathogenic bacteria of genus *Leptospira*. The disease is considered a worldwide zoonosis and regarded as a major public health problem. It is expected that over 1 million new infections annually may occur, resulting in about 60 thousand deaths. In Brazil, outbreaks occur mainly in rainfall periods in metropolitan areas that have inadequate infrastructure, favoring the proliferation of rodents, which are the main reservoirs of the disease. Measures to control the disease are difficult to implement. The development of new strategies to prevent and control the spread of disease is urgently needed. Accordingly, prophylactic vaccines or immunotherapeutic emerge as strong candidates to fight the problem. For this reason, currently research has focused to identify conserved antigens that might be involved in host-pathogen interactions. Considering these requirements as being essential for the development of a vaccine, this project selected three hypothetical proteins (LIC13479, LIC10050 and LIC10537) of *L. interrogans*, predicted to be localized at the bacterial surface. These coding sequences (CDSs) were characterized for their possible role in pathogenesis and their potential to protect animals against challenge with virulent leptospires. Genes were amplified by PCR using DNA from *L. interrogans* serovar Copenhageni. The DNA fragments generated were cloned into the expression vector pAE and expressed in *Escherichia coli*. The recombinant proteins were purified by metal affinity chromatography and the presence of secondary structure was evaluated by circular dichroism. *In silico* analysis showed that the coding sequences of these proteins are conserved in several species and serovars of leptospires. Cellular localization assays have shown that these proteins are surface-exposed, in agreement with the *in silico* analysis. The recombinant proteins were recognized by confirmed human leptospirosis serum samples, suggesting that these proteins are expressed during the infection. Adhesion assays with extracellular matrix (ECM) components have shown that rLIC13479 and rLIC10050 proteins were able to bind with laminin in a dose-dependent and saturable manner and they were named Lsa46 and Lsa77 (*Leptospiral Surface Adhesin*, followed by their respective molecular masses), respectively. Both proteins were also able of binding to plasminogen (PLG) and plasma fibronectin. The coding sequence LIC10537 was cloned in two fragments, and recombinant proteins were generated corresponding to N-terminal (fragment 1) and C-terminal (fragment 2) portion. Fragment 2 was able to interact with PLG in a dose-dependent manner. All proteins interacting with the PLG were able to generate active plasmin, suggesting that these proteins might participate in leptospiral invasion of the host. The evaluation of the immunogenic activity of recombinant proteins was performed in mice and showed that all proteins were able of inducing an immune response. When the cytokine profile generated was analyzed in the supernatant of cells in culture, the majority of the formulations tested were able to produce a mixed pattern of Th1/Th2 immune responses. Evaluation of recombinant proteins immunoprotection in leptospirosis hamster model followed by challenge with virulent bacteria showed that the recombinant proteins conferred partial protection, depending on the adjuvant employed. Taken together, our data suggest that these novel proteins are expressed during infection and may have role in leptospiral pathogenesis.

Keywords: *Leptospira*. Leptospirosis. Recombinant proteins. Pathogenesis. Vaccine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Arquitetura de membrana de <i>Leptospira</i>	24
Figura 2 – Ciclo de transmissão da leptospirose.....	26
Figura 3 – Esquema representativo das proteínas apresentando os respectivos domínios.	66
Figura 4 – Análiseda conservação <i>in silico</i> entre <i>Leptospira</i> spp.	67
Figura 5 – Extração de DNA genômico de <i>Leptospira</i> spp.....	70
Figura 6 – Análise da presença dos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 em <i>Leptospira</i> spp.....	71
Figura 7 - Análise da presença dos transcritos dos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537.....	73
Figura 8 – Expressão dos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 em <i>Leptospira</i> spp....	75
Figura 9 – Amplificação dos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 por PCR.....	77
Figura 10 – Análise de restrição enzimática de clones selecionados a partir do vetor de clonagem pGEM-T Easy.....	78
Figura 11 – Análise da extração de DNA plasmidial por fenol-clorofórmio.....	79
Figura 12 – Análise de restrição enzimática de clones selecionados a partir do vetor pAE.	79
Figura 13 – Eletroferograma das sequências de DNA.	81
Figura 14 – Esquema representativo dos fragmentos referente ao gene LIC10537.	82
Figura 15 – Análise dos fragmentos amplificados referente ao gene LIC10537 por PCR.	82
Figura 16 – Análise de restrição enzimática de clones selecionados a partir do vetor de clonagem pGEM-T Easy.....	83
Figura 17 – Análise de restrição enzimática de clones selecionados a partir do vetor pAE.	84
Figura 18 – Eletroferograma das sequências de DNA.	85
Figura 19 – Análise de expressão da proteína recombinante LIC13479 em linhagens de <i>E. coli</i> geneticamente modificadas..	86
Figura 20 – Análise de expressão da proteína recombinante LIC10050 em linhagens de <i>E. coli</i> geneticamente modificadas..	88

Figura 21 – Expressão dos fragmentos recombinantes gerados a partir do gene LIC10537.....	89
Figura 22 – Análise por SDS-PAGE das amostras obtidas após processo de purificação e estimativa da concentração das proteínas recombinantes.....	91
Figura 23 – Reatividade de anticorpos específicos contra as proteínas recombinantes por <i>Western blotting</i>	93
Figura 24 – Análise de estrutura secundária por dicroísmo circular.....	95
Figura 25 – Análise por SDS-PAGE de extratos protéicos de <i>Leptospira</i> spp.	98
Figura 26 – Detecção das proteínas nativas em extratos de <i>Leptospira</i> spp.....	99
Figura 27 – Reatividade das proteínas recombinantes com amostras de soro.	102
Figura 28 – Padrão das proteínas após o fracionamento com Triton X-114 de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.	105
Figura 29 – Localização celular das proteínas nativas por imunofluorescência..	107
Figura 30 – Detecção das proteínas nas leptospiros intacta.	110
Figura 31 – Interação das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular.....	113
Figura 32 – Dose-resposta da ligação das proteínas recombinantes à laminina.....	115
Figura 33 – Efeito dos anticorpos policlonais anti-Lsa46 e anti-Lsa77 na ligação das proteínas recombinantes à laminina.....	117
Figura 34 – Efeito da interação das proteínas desnaturadas à laminina.	118
Figura 35 – Interação das <i>L. interrogans</i> com laminina na presença das proteínas recombinantes..	120
Figura 36 – Participação dos resíduos de carboidratos na interação de laminina com as proteínas recombinantes.	122
Figura 37 – Interação das proteínas recombinantes a componentes do plasma.....	126
Figura 38 – Dose-resposta da ligação das proteínas recombinantes aos componentes do plasma..	127
Figura 39 – Efeito dos anticorpos policlonais anti-Lsa46 e anti-Lsa77 na ligação das proteínas recombinantes ao PLG e fibronectina plasmática.....	129
Figura 40 – Efeito da ligação do PLG e fibronectina plasmática com as proteínas desnaturadas.	130
Figura 41 – Interação das <i>L. interrogans</i> com PLG e fibronectina plasmática na presença das proteínas recombinantes..	132

Figura 42 – Efeito do ácido aminocaproico (ACA) na ligação das proteínas recombinantes ao PLG.....	134
Figura 43 – Ativação do PLG ligado às proteínas recombinantes.	136
Figura 44 – Interferência entre PLG, laminina e fibrinectina na ligação as proteínas recombinantes..	138
Figura 45 – Produção de IgG total em camundongos BALB/c imunizados com os candidatos vacinais.....	142
Figura 46 – Avaliação <i>in vitro</i> da proliferação de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com os candidatos vacinais.....	145
Figura 47 – Secreção de citocinas no sobrenadante de esplenócitos estimulados <i>in vitro</i>	150
Figura 48 - Análise da sobrevivência dos animais desafiados com uma cepa virulenta de <i>Leptospira</i>	153
Figura 49 – Titulação de anticorpos produzidos após imunização com a proteína Lsa46.	158
Figura 50 – Análise da sobrevivência dos animais desafiados com uma cepa virulenta de <i>Leptospira</i>	162
Figura 51 – Titulação de anticorpos produzidos após imunização com a proteína Lsa77.	165
Figura 52 – Análise da sobrevivência dos animais desafiados com uma cepa virulenta de <i>Leptospira</i>	168

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de oligonucleotídeos empregada para amplificação dos genes de interesse.....	40
Tabela 2 – Resumo das análises realizadas por bioinformática.....	69
Tabela 3 – Alinhamento dos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 em <i>Leptospira</i> spp.....	72
Tabela 4 – Análise dos espectros pelo programa CAPITO.....	95
Tabela 5 – Comparação da afinidade de ligação das proteínas caracterizadas pelo nosso grupo.....	123
Tabela 6 – Títulos de anticorpos IgG obtidos após as imunizações com as formulações vacinais	143
Tabela 7 – Índice de estimulação	145
Tabela 8 – Efeito da imunização das formulações vacinais contendo Lsa46.....	156
Tabela 9 – Efeito da imunização das formulações vacinais contendo Lsa77.....	164
Tabela 10 – Efeito da imunização das formulações vacinais contendo os fragmentos da LIC10537.....	169

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorbância
ACA – ácido aminocaproico
AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida
Amp – ampicilina
BrdU – bromodesoxiuridina
BSA – albumina do soro bovino
C4BP – C4 *binding protein*
CD – dicroísmo circular
CDSs – *coding sequences*
cDNA – DNA complementar
ConA – Concanavalina A
C_T – ciclo *threshold*
ddNTP – didesoxirribonucleotídeo
dNTP – desoxirribonucleotídeo
DDA – *dimethyldioctadecylammonium bromide*
DEPC – dietilpirocarbonato
DNA – ácido desoxirribonucleico
DO – densidade óptica
ECM – *extracellular matrix*
EDTA – ácido etilenodiamino tetracético
ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay*
EMJH – Ellinghausen-McCullough/ Johnson-Harris
FITC – isotiocianato de fluoresceína
FH – fator H
IFN – interferon
IL – interleucina
IP – iodeto de propídeo
IPTG – isopropil- β -tiogalactopiranosídeo
LB – meio Luria Bertani
Len – *leptospiral endostatin-like*
LIC – *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

Lig – *leptospiral immunoglobulin-like*

LPHS – síndrome hemorrágica pulmonar associada à leptospirose

LPS – lipopolissacarídeo

Lsa – *leptospiral surface adhesin*

MAT – teste de microaglutinação

MPLA – monofosforil lipídeo A

NTC – *no template control*

OMP – proteína de membrana externa

OmpA-like – proteína contendo o domínio OmpA-like

OPD – cloridrato de o-fenilenodiamina

PBS – fosfato salina

PBS *ls* – PBS *low salt*

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

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

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

PLG – plasminogênio

PMSF – *phenylmethylsulfonyl fluoride*

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotação por minuto

RPMI – meio Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

RT-qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa

SDS – dodecil sulfato de sódio

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

TAE – tris-acetato EDTA

T_m – temperatura de *melting*

TNF – fator de necrose tumoral

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	<i>Leptospira</i> spp. e Leptospirose	23
1.2	Mecanismos de patogenicidade.....	28
1.3	Resposta imune na infecção	31
1.4	Desenvolvimento de Vacinas.....	32
2	OBJETIVOS	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Condições de cultivo e <i>Leptospira</i> spp.	38
3.2	Seleção <i>in silico</i> dos genes de interesse	38
3.3	Construção de oligonucleotídeos específicos	39
3.4	Extração de DNA genômico das <i>Leptospira</i> spp.....	41
3.5	Procedimentos de clonagem dos genes selecionados de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	41
3.6	Sequenciamento dos clones	43
3.7	Extração de RNA e transcrição reversa (RT-PCR).....	44
3.8	Análise da presença dos genes e respectivos transcritos entre diferentes cepas de <i>Leptospira</i>.....	45
3.9	<i>Real Time</i> RT-PCR (RT-qPCR)	45
3.10	Expressão das proteínas recombinantes	46
3.11	Purificação e diálise das proteínas recombinantes	47
3.12	Dicroísmo circular (CD)	48
3.13	Deteção das proteínas por <i>Western blotting</i>	49
3.14	Ensaio de imunofluorescência.....	50
3.15	Fracionamento celular por Triton X-114	50
3.16	ELISA para detecção das proteínas nas leptospiros intacta.....	51
3.17	Deteção de anticorpos IgG em soros de humanos.....	52
3.18	Componentes biológicos	53
3.19	Ensaio de adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular e soro	53
3.20	Curva de dose-resposta da ligação das proteínas recombinantes aos componentes.....	54

3.21	Ensaio de inibição da ligação pela incubação com antissoro anti-proteína recombinante.....	54
3.22	Ensaio de inibição da ligação pela desnaturação térmica das proteínas recombinantes	55
3.23	Caracterização da ligação das proteínas recombinantes à laminina	55
3.24	Caracterização da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio	56
3.25	Ensaio de atividade enzimática da plasmina	56
3.26	Interferência entre os componentes na ligação às proteínas recombinantes.....	57
3.27	Ensaio de inibição da ligação das leptospiros vivas ao componente	57
3.28	Imunização de camundongos com as proteínas recombinantes	58
3.29	Titulação dos anticorpos	58
3.30	Linfoproliferação celular.....	59
3.31	Dosagem de citocinas	60
3.32	Ensaio de imunoproteção	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1	Capítulo I.....	63
4.1.1	<i>Seleção por bioinformática de genes de Leptospira como possível alvo vacinal.....</i>	64
4.1.2	<i>Análise in vitro da presença dos genes e expressão em Leptospira spp.</i>	69
4.2	Capítulo II	76
4.2.1	<i>Clonagem, expressão e purificação dos candidatos vacinais</i>	77
4.3	Capítulo III.....	96
4.3.1	<i>Avaliação da expressão das proteínas selecionadas para o presente estudo</i>	97
4.3.2	<i>Avaliação da localização celular das proteínas selecionadas</i>	103
4.4	Capítulo IV	111
4.4.1	<i>Avaliação e caracterização do potencial que as proteínas apresentam como ligantes a componentes da matriz extracelular</i>	112
4.4.2	<i>Avaliação e caracterização do potencial que as proteínas apresentam como ligantes a componentes do plasma humano</i>	124
4.4.3	<i>Avaliação da interferência entre os componentes na ligação com as proteínas recombinantes</i>	137
4.5	Capítulo V.....	139

4.5.1	<i>Avaliação da resposta imune obtida para os candidatos vacinais em camundongos BALB/c</i>	140
4.5.2	<i>Avaliação imunoprotetora das formulações vacinais em hamsters</i>	150
5	CONCLUSÕES	170
	REFERÊNCIAS*	173
	ANEXO - Súmula curricular	189

1.1 *Leptospira* spp. e Leptospirose

A leptospirose, primeiramente descrita como doença de Weil em 1886 por Adolf Weil, é uma doença sistêmica causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (LEVETT, 2001). Atualmente é considerada uma importante zoonose mundial por representar um enorme problema de saúde pública. Acredita-se que o número de casos de leptospirose no mundo é muito maior do que a organização mundial de saúde estima. É possível que mais de um milhão de novas infecções por ano possam acontecer, resultando em cerca de 60 mil mortes (COSTA et al., 2015). A prevalência da doença está delimitada às regiões Sul e Sudeste da Ásia, Oceania, Caribe, África, Oriente Subsaariano e regiões Andina, Central e Tropical da América Latina (COSTA et al., 2015).

No Brasil, são relatados cerca de 3 a 4 mil casos por ano, sendo que a maioria ocorre nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Paraná, Pernambuco e Espírito Santo. Contudo, os estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Roraima, Rio Grande do Norte e Paraíba são considerados regiões endêmicas (SVS/MS/Brasil, 2006-2011). Um dos fatores responsáveis por aumentar o número de casos de leptospirose nessas regiões são enchentes e alagamentos causados durante os períodos de chuva. Esta condição é propícia para os roedores, que são os principais reservatórios da doença. Em particular, a espécie *Rattus norvegicus* (rato de esgoto) e *Rattus rattus* (rato de telhado) merecem destaque, pois são os principais portadores de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; BHARTI et al., 2003; EVANGELISTA; COBURN, 2010).

As leptospirosas são bactérias que pertencem à ordem *Spirochaetales*, a qual inclui outros patógenos de importância médica, como o agente da doença de Lyme e da sífilis. De modo geral, as espiroquetas são bactérias finas, enroladas de forma helicoidal e apresentam motilidade graças à presença de um mecanismo flagelar contido dentro do envelope externo. As leptospirosas são facilmente distinguidas de outras espiroquetas por apresentarem uma característica morfológica única em suas extremidades, que são semelhantes a um ponto de interrogação (EVANGELISTA; COBURN, 2010; FAINE et al., 1999; LI et al., 2000). Além disso, as leptospirosas apresentam uma arquitetura de membrana que se assemelha tanto a bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (Figura 1). A associação íntima da membrana citoplasmática com o peptídeoglicano é uma característica inerente às bactérias Gram-positivas, já a presença de membrana citoplasmática, membrana externa e

lipopolissacarídeo (LPS) são características de bactérias Gram-negativas (HAAKE, 2000; HAAKE; MATSUNAGA, 2010).

Fernandes et al., 2015

Figura 1 – Arquitetura de membrana de *Leptospira*. OM – outer membrane, OS – periplasmic space, IM – inner membrane, F – flagellum, PG – peptidoglycan.

Enquanto em outras espiroquetas o LPS é ausente, em leptospiros essa estrutura é o principal componente de superfície. Assim como em bactérias Gram-negativas, o LPS de leptospiros é composto por lipídeo A, uma parte central (*core*) e polissacarídeo ou antígeno O (BULACH et al., 2000; PATRA et al., 2015). Embora a estrutura do LPS de leptospiros seja similar ao LPS de outras bactérias Gram-negativas, a toxicidade observada em relação ao LPS de *E. coli* é menor. Possivelmente, características únicas encontradas na região do lipídeo A, sejam responsáveis por essa toxicidade reduzida (HAAKE; ZÜCKERT, 2015; QUEGEWIRTH et al., 2004). Além disso, diferenças nessas regiões são responsáveis pelo reconhecimento diferencial, mediado por receptores *Toll-like 4* (TLR4), visto que o LPS de leptospira é incapaz de interagir com este receptor humano (WERTS et al., 2001).

Apesar dessas características peculiares, o LPS de leptospiros apresenta funções que se destacam, primeiro porque a resposta imune direcionada para o LPS é a base de proteção das vacinas inativadas de leptospiros (*bacterina*), e segundo, porque é a base da classificação

sorológica dessas bactérias (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; MIDWINTER et al., 1994). Mais de 250 sorovares ou sorotipos de leptospiros já foram identificados pelo teste de microaglutinação (MAT), que avalia a capacidade dos anticorpos se aglutinarem após o reconhecimento de epitopos antigênicos presentes na porção variável do LPS. Sorovares que apresentam antígenos em comum são classificados em sorogrupo (HAAKE; ZÜCKERT, 2015; PLANK; DEAN, 2000). A classificação sorológica das leptospiros tem grande relevância epidemiológica, tão é verdade, que mesmo após as leptospiros terem sido classificadas geneticamente, a sorologia continua sendo a classificação mais utilizada para diferenciação das leptospiros.

A classificação genética das leptospiros, feita por hibridização de DNA, tem revelado a existência de 20 espécies. Análises filogenéticas dos genes dos RNAs ribossomais 16S dividem essas espécies de leptospiros em três grupos distintos: patogênicas, saprofíticas e intermediárias. O grupo das espécies saprofíticas é formado pelas espécies *L. kmetyi*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. biflexa*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae* e *L. yanagawae*, enquanto o grupo das espécies intermediárias, que foram classificadas dessa maneira pelo fato dos mecanismos envolvidos na patogenicidade não serem tão conhecidos, é formado pelas espécies *L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii* e *L. licerasiae*. Por fim, as espécies envolvidas na patogênese da leptospirose são: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchi*, *L. weilii*, *L. kirschneri*, *L. alexanderi* e *L. alstoni* (CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009).

Apesar do grupo das patogênicas ser formado por 8 espécies, metade dos sorovares patogênicos são classificados em *L. interrogans* ou *L. borgpetersenii* (AHMED et al., 2006), sendo que, os sorovares Pomona, Icterohaemorrhagiae, Bataviae, Autumnalis e Copenhageni de *L. interrogans* estão associados à infecção de porcos, gados e roedores e, consequentemente, à infecção de humanos, visto que os humanos são considerados hospedeiros acidentais e terminais da doença (FAINE et al., 1999). Assim, a infecção por leptospiros patogênicas pode ocorrer tanto após contato direto com a urina de um animal contaminado como de forma indireta, por meio da água ou solo contaminado. As leptospiros penetram no indivíduo via mucosas ou por meio de pequenos ferimentos encontrados na pele. Casos de penetração com a pele íntegra, mas com poros dilatados, têm sido observados quando há contato prolongado com o ambiente úmido contaminado. Após a penetração, essas bactérias são capazes de disseminar-se pelo sistema linfático ou pela corrente sanguínea para múltiplos órgãos (Figura 2). No entanto, a evolução da doença é dependente de alguns fatores relacionados ao hospedeiro, como o estado imunológico e a idade, assim como de fatores

relacionados à própria bactéria, como o tipo de cepa e a dose infectante (CINCO, 2010; FAINE et al., 1999).

Figura 2 – Ciclo de transmissão da leptospirose

Baseado na interação patógeno-hospedeiro, a leptospirose pode apresentar tanto manifestações clínicas leves quanto severas. Aproximadamente 90 % dos casos progridem de forma discreta e autolimitada, cujos sintomas iniciais são febre, dores de cabeça, dores musculares, náuseas e vômitos, sendo confundidos na maioria das vezes com viroses. No entanto, de 5 % a 10 % dos indivíduos infectados evoluem para uma forma severa da doença, conhecida como síndrome de Weil, que é caracterizada por complicações em múltiplos órgãos, incluindo hemorragia, disfunção renal e hepática, além de dano cardiovascular. Essa forma da doença é responsável por 5-15 % das mortes provocadas por leptospirose. Outra forma severa de leptospirose que tem sido destacada atualmente é a Síndrome Hemorrágica Pulmonar associada à Leptospirose (LPHS), que é caracterizada por um sangramento intenso no pulmão e dano tecidual agudo, indicando que a patogênese dessa síndrome de fato é diferente da síndrome de Weil. Além disso, essa forma da doença está associada a uma maior gravidade,

visto que a taxa de mortalidade de LPHS é superior a 50 % dos casos (EVANGELISTA; COBURN, 2010; GOUVEIA et al., 2008; MAROTTO et al., 1999; SPICHLER et al., 2007; YANG, 2007).

O fato dos sintomas iniciais de leptospirose serem comuns aos de outras doenças dificulta o diagnóstico clínico. Atualmente, as técnicas utilizadas para o diagnóstico de *Leptospira* incluem a detecção de anticorpos pelo uso de testes de microaglutinação (MAT) e ensaio imunoenzimático. Além disso, leptospirosas podem ser detectadas após o cultivo de urina ou tecidos infectados, ou por meio da técnica de PCR. No entanto, a confirmação de leptospirose por cultura se torna inviável devido às dificuldades encontradas para o isolamento de leptospirosas. Por PCR, as dificuldades encontradas se baseiam no fato de que muitos laboratórios não são equipados para realizar tais testes (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

O método de MAT, embora apresente algumas desvantagens, ainda é o mais utilizado e considerado como teste “padrão ouro” para o diagnóstico da leptospirose. No entanto, esse teste é realizado apenas nos laboratórios de referência, onde diversas espécies e sorovares de leptospirosas estão disponíveis. Assim, soros de indivíduos supostamente contaminados são incubados com esse painel de bactérias, onde a maior diluição do soro capaz de aglutinar 50% das bactérias é considerada como título, sendo que o título determinado para considerar a reação positiva é variável de acordo com cada região. Nesse teste, é recomendada a análise de amostras pareadas de soro, visto que no início da doença os indivíduos ainda não apresentam anticorpos circulantes. Assim, soros de indivíduos analisados inicialmente podem gerar resultados negativos (MAT-), porém quando analisados novamente, resultados positivos podem ser encontrados (MAT+). Assim, apesar do teste MAT ser sensível e específico, resultados positivos só são gerados após o início da fase imune, que ocorre por volta de 10 dias após o contato inicial com as leptospirosas. Por isso, a busca por um método laboratorial mais rápido, fácil e preciso ainda é necessário, pois dessa forma poderá controlar de forma efetiva o agravamento da doença por proporcionar um tratamento inicial adequado (FAINE et al., 1999; GUERRA, 2013; LEVETT, 2001).

O tratamento da leptospirose é à base de antimicrobianos e terapia de suporte. As leptospirosas são sensíveis a vários antibióticos, sendo que o tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível, logo na primeira semana de infecção, porque reduz a evolução para os quadros severos da doença. Em geral, o antibiótico de escolha é a penicilina, no entanto, eritromicina e tetraciclina também são utilizadas. Em casos severos da doença, o tratamento com antibióticos é realizado por via intravenosa por pelo menos 7 dias. Embora o tratamento

com antibióticos seja efetivo, preocupações com questões relacionados a resistência bacteriana reforçam a necessidade de tratamentos mais eficazes. Neste contexto, vacinas profiláticas ou imunoterapêuticas surgem como fortes candidatos para contornar o problema (VIJAYACHARI; SUGUNAN; SHRIRAM, 2008; YANG, 2007).

Contudo, vacinas contra leptospirose ainda não estão disponíveis para uso em humanos no Brasil. Apenas Cuba, Japão, China e França possuem vacinas licenciadas para humanos, porém essas preparações são baseadas em leptospiros inativadas ou preparações de membrana que, semelhante às vacinas veterinárias, falham em montar uma resposta imunológica duradoura, além de conferir proteção somente contra sorovares presentes na preparação. Além disso, devido aos sérios efeitos colaterais observados após a administração da vacina, casos de desistência do reforço vacinal são frequentes. Assim, a busca por novas estratégias vacinais são essenciais para a prevenção da leptospirose (DELLAGOSTIN et al., ; LAURICHESSE et al., 2007; MARTINEZ et al., 2004; YAN et al., 2003; YANAGIHARA et al., 2007).

1.2 Mecanismos de patogenicidade

O sucesso durante uma infecção é dado pela capacidade que os microrganismos apresentam frente aos processos de adesão, invasão e evasão do sistema imune. Assim, uma vez em contato com o hospedeiro, os microrganismos devem ser capazes de aderir de forma eficiente à pele ou mucosa do hospedeiro, invadir as células a fim de facilitar os processos de colonização e disseminação para múltiplos órgãos e, ainda, promover danos nesses órgãos e tecidos. Em todas essas etapas, os microrganismos devem escapar ou alterar a resposta imune do hospedeiro para obtenção do sucesso. Assim, a capacidade de um microrganismo causar doença está totalmente relacionada ao seu potencial em desenvolver estratégias capazes de contornar as barreiras do hospedeiro. Tais estratégias envolvem a ativação de genes relacionados à virulência, estresse, transporte de nutrientes, locomoção entre outros.

Os mecanismos envolvidos na patogenicidade das leptospiros não são totalmente conhecidos, mas graças ao sequenciamento do genoma de espécies patogênicas de *Leptospira*, grandes avanços puderam ser obtidos e sugerem o potencial patogênico apresentado pelas leptospiros (BULACH et al., 2006; CHOU et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2004a; NASCIMENTO et al., 2004b; REN et al., 2003). Assim, ao que tudo indica, as leptospiros apresentam em sua superfície uma série de proteínas que são responsáveis por mediar adesão às células do hospedeiro, aos componentes da matriz extracelular (ECM) e a interação com

componentes do plasma humano. Além disso, algumas proteínas se destacam por apresentarem atividade multifuncional, sendo capazes de se ligar tanto à ECM como aos componentes do plasma.

A matriz extracelular é formada por componentes fluidos e fibrosos, como glicosaminoglicanos, proteoglicanos, colágeno, elastina, fibronectina e laminina (ALBERTS et al., 2007). Essa estrutura característica de mamíferos desempenha várias funções importantes, incluindo a função de suporte e conexão de células e tecidos. Contudo, durante a evolução, os microrganismos patogênicos desenvolveram a capacidade de interagir com esses componentes a fim de facilitar a invasão nas células do hospedeiro. A interação de *L. interrogans* com laminina, colágeno I, colágeno IV, fibronectina plasmática e celular foi demonstrada pela primeira vez pelo nosso grupo, sugerindo a presença de moléculas adesivas presente em sua superfície. Assim, a primeira proteína de leptospira com capacidade de ligação a laminina foi identificada e nomeada de Lsa24 (BARBOSA et al., 2006). A partir daí, diversas proteínas têm sido identificadas com capacidade de ligação a ECM (VIEIRA et al., 2014; FERNANDES et al., 2015).

LipL32 é a proteína mais abundante das leptospirosas patogênicas. Embora os primeiros estudos tenham demonstrado sua localização na superfície da bactéria, dados recentes sugerem sua localização na subsuperfície (HAAKE et al., 2000; PINNE; HAAKE, 2013). Apesar disso, a ligação de LipL32 com laminina e colágeno foi demonstrado (HAUK et al., 2008; HOKE et al., 2008). Outra proteína interessante presente na membrana das leptospirosas consiste na família de proteínas que apresentam domínios do tipo imunoglobulinas (Ig), nomeadas como LigA, LigB e LigC. As proteínas Ligs apresentam características interessantes para a patogênese da bactéria, uma vez que estão presente apenas nas linhagens patogênicas, são expressas durante a infecção, atenuadas após passagens em cultura e reguladas por condição osmótica (MATSUNAGA et al., 2003; MATSUNAGA et al., 2005). Além de se ligarem a laminina, fibronectina, colágeno IV e colágeno I (CHOY et al., 2007). Apesar das propriedades apresentadas para essas proteínas serem relevantes para a patogenicidade das leptospirosas, quando mutantes foram analisados tanto para o gene *lipl32* e *ligB*, nenhuma redução na virulência foi observada (CRODA et al., 2008; MURRAY et al., 2009).

A segunda proteína mais abundante presente na superfície das leptospirosas, denominada de Loa22, contém o domínio do tipo OmpA (*OmpA-like*) (KOIZUMI; WATANABE, 2003). Esses domínios são regiões de ligação ao peptidoglicano, geralmente encontrados em proteínas que promovem um *link* entre a membrana e a parede celular. Apesar da proteína

Loa22 não apresentar interação com ECM, foi o primeiro fator de virulência identificado, após a mutação do seu gene (RISTOW et al., 2007). A proteína Lsa66, outra proteína com domínio *OmpA-like*, quando teve seu papel avaliado quanto à interação com ECM, demonstrou propriedades de interação com laminina. Além disso, essa proteína foi reconhecida pelo soro de indivíduos contaminados, sugerindo sua expressão durante a infecção (OLIVEIRA et al., 2011). Outra proteína identificada com domínio *OmpA-like* foi denominada de OmpA70, porém seu papel na adesão a ECM não foi investigado (FRAGA et al., 2010).

OmpL1 foi uma das primeiras porinas descritas em espiroquetas. O interesse em estudar essas proteínas se deve à sua localização na superfície da bactéria que facilita as interações patógeno-hospedeiro e, ainda, serve como potencial alvo para o reconhecimento imune (HAAKE et al., 1993; HAAKE et al., 1991). A capacidade de ligação da proteína OmpL1 à ECM quando avaliada, mostrou que esta proteína foi capaz de mediar a ligação à laminina e fibronectina. Além disso, OmpL1 foi capaz de inibir a ligação das leptospiros vivas a estes componentes, o que reforça essa interação (FERNANDES et al., 2012).

Outras proteínas de leptospiros com capacidade de ligação à ECM também foram descritas pelo nosso grupo. Lsa27, Lsa20, Lsa25, Lsa33 e Lsa26 são proteínas de leptospiros identificadas quanto à sua capacidade de interação com laminina (DOMINGOS et al., 2012; LONGHI et al., 2009; MENDES et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2013), enquanto outras proteínas, como LipL53 e Lsa21, foram descritas com base na sua ligação à laminina, colágeno IV, fibronectina celular e plasmática. Além disso, a expressão dessas proteínas parece ser restrita a linhagens virulenta e, ainda, Lsa21 parece ser regulada por condição osmótica e temperatura, sugerindo o seu potencial para patogênese da bactéria (ATZINGEN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010). Outras proteínas que apresentam capacidade de ligação a vários componentes da ECM já foram identificadas (FERNANDES et al., 2015; VIEIRA et al., 2014).

Após o processo de adesão, as leptospiros devem ser capazes de invadir as células do hospedeiro. Para isso, tem sido demonstrado que a interação da bactéria com o sistema fibrinolítico do hospedeiro, um sistema enzimático complexo cuja principal função é dissolver o coágulo sanguíneo, contribui significativamente para a virulência de muitos patógenos (LAHTEENMAKI; KUUSELA; KORHONEN, 2001). Nosso grupo demonstrou pela primeira vez, a capacidade das leptospiros de capturar o plasminogênio (PLG) em sua superfície e, na presença de um ativador, ser convertida em plasmina (PLA), o que confere à bactéria um poder proteolítico capaz de degradar laminina e fibronectina, contribuindo na

invasão das leptospiros (VIEIRA et al., 2013; VIEIRA et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que a atividade de plasmina pode conferir alguma vantagem relacionada à evasão imune, visto que plasmina gerada na superfície das leptospiros foi capaz de interferir na deposição de IgG e C3b na superfície da bactéria, reduzindo o processo de opsonização (VIEIRA et al., 2011). Diante da importância desse sistema, diversas proteínas de membrana de leptospiros têm sido avaliadas quanto à interação com PLG, sendo que uma quantidade bastante expressiva de proteínas foi identificada como receptores de PLG (DOMINGOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2014; FERNANDES et al., 2012; MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2016; SOUZA et al., 2012; VIEIRA et al., 2010a; VIEIRA; NASCIMENTO, 2015).

Outra estratégia desenvolvida por leptospiros para escapar da resposta imune é se ligar aos reguladores do complemento Fator H (FH) e C4BP (*C4b-binding protein*) e, consequentemente, interferir com a sinalização imune (BARBOSA et al., 2009; MERI et al., 2005). A primeira proteína identificada como ligante de FH foi a proteína LfhA/Lsa24/LenA, que também foi identificada como ligante de laminina pelo nosso grupo (VERMA et al., 2006). Até o momento, todos os receptores identificados retêm a atividade do cofator, o que impede a ativação da cascata do complemento e o reconhecimento do patógeno. As proteínas LigA e LigB que foram identificadas como adesinas, apresentaram a capacidade de interagir tanto com FH como C4BP (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). A proteína LcpA foi caracterizada como ligante de C4BP e, mais recentemente, foi demonstrado a capacidade de ligação ao FH e vitronectina, outro componente do complemento (DA SILVA et al., 2015). Outras proteínas com propriedades multifuncionais também foram identificadas pelo nosso grupo, como ligantes de C4BP (DOMINGOS et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2016; SOUZA et al., 2012).

1.3 Resposta imune na infecção

Embora na literatura seja bem estabelecido que a imunidade protetora contra leptospiros dependa da produção de anticorpos contra o LPS específico do sorovar, os mecanismos de imunidade inata envolvidos na infecção por leptospiros são poucos conhecidos. A esse respeito, um trabalho realizado com camundongos duplo-mutante *TLR2/TLR4*, tem sugerido que a presença desses receptores é necessária para o desenvolvimento de uma resposta imune inata efetiva (CHASSIN et al., 2009). Além disso, quando animais deficientes apenas em um dos receptores foram analisados após a infecção

por leptospirosas, um papel compensatório desses dois receptores pareceu existir, sugerindo a importância da ativação de ambos os receptores para o controle da infecção em camundongos. Como *TLR4* humano não é ativado pelo LPS das leptospirosas (NAHORI et al., 2005), provavelmente essa diferença na ativação de uma resposta imune inata entre os hospedeiros de manutenção (camundongos e ratos) e hospedeiros acidentais (humanos) explicaria o quadro de resistência e suscetibilidade à infecção, respectivamente. Assim, a proteção obtida nos animais de manutenção da doença talvez seja mediada por uma resposta imune gerada após ativação do receptor *TLR4*. Enquanto a falta de ativação deste receptor em humanos poderia ser o responsável pela geração de uma resposta imune desequilibrada, o que facilitaria a infecção por leptospirosas e, conseqüentemente, a doença (CHASSIN et al., 2009; EVANGELISTA; COBURN, 2010).

Em relação às citocinas, estudos apontam que IFN- γ , IL-12 e TNF- α são liberados durante a infecção (DE FOST et al., 2003). Outro estudo realizado com 68 indivíduos com leptospirose severa demonstrou a presença de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e ST2 (receptor de IL-33), sendo que níveis de IL-6, IL-8 e ST2 foram encontrados em maior quantidade nos indivíduos que foram a óbito (WAGENAAR et al., 2009). Mais recentemente, um estudo tem associado TNF- α com casos severos da doença, enquanto a presença de IL-10 parece estar relacionado à proteção. No entanto, dados conflitantes têm sido gerados, visto que a presença de IL-10 também foi associada a casos fatais da doença (KYRIAKIDIS; SAMARA; PAPA, 2011; VOLZ et al., 2015).

1.4 Desenvolvimento de Vacinas

Diante a problemática apresentada para as vacinas disponíveis para leptospirose, o foco principal das pesquisas atuais está voltado para a identificação de candidatos vacinais, que sejam capazes de promover uma resposta imunológica protetora e de amplo espectro. Novamente, os avanços obtidos a partir do sequenciamento do genoma de leptospirosas patogênicas contribuíram significativamente para a identificação de candidatos vacinais a partir da vacinologia reversa (VR) (NASCIMENTO et al., 2004b; RAPPUOLI, 2000). Essa abordagem, que foi utilizada com sucesso no desenvolvimento de vacinas para *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*, permite a seleção de candidatos vacinais baseados nas análises *in silico* de suas sequências gênicas (PIZZA et al., 2000; WIZEMANN et al., 2001).

Assim, após a disponibilidade das sequências genômicas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, um grande projeto Piloto Funcional foi iniciado no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan. O primeiro passo foi separar, por meio de ferramentas de bioinformática, as sequências codificadoras em proteínas expressas na superfície da célula e as não expostas. Nesta seleção, 2000 sequências codificadoras foram identificadas, e com base em outras análises, 437 proteínas foram selecionadas. O foco está na identificação de proteínas de membrana externa conservadas entre os diferentes sorovares patogênicos de leptospira. Devido à localização, essas proteínas podem participar das interações patógeno-hospedeiro e, ainda, servir de alvo para o sistema imune. Nesse sentido, algumas proteínas de membrana, analisadas por programas de bioinformática têm sido identificadas como possíveis candidatos vacinais em modelo animal (ATZINGEN et al., 2010; ATZINGEN et al., 2012; CULLEN et al., 2002; GAMBERINI et al., 2005; HAAKE et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2004a; NASCIMENTO et al., 2004b; PALANIAPPAN et al., 2006; REN et al., 2003; YAN et al., 2009).

A primeira vacina recombinante testada contra leptospirose foi baseada em duas proteínas de membrana identificadas como OmpL1 e LipL41. Essas proteínas, quando avaliadas de forma sinérgica, foram capazes de induzir uma resposta protetora, visto que 71 % dos animais sobreviveram após o desafio (HAAKE et al., 1999). A partir dessas evidências experimentais, várias outras proteínas de leptospirose têm sido testadas como candidatos vacinais. LipL32, a proteína imunodominante de leptospirose, já foi testada na forma de vacina de DNA (BRANGER et al., 2005), BCG como veículo vivo expressando LipL32 (SEIXAS et al., 2007), LipL32 coadministrada com a subunidade B da toxina LT de *E. coli* (GRASSMANN et al., 2012) e fusionada a LigANI (LUCAS et al., 2011). No entanto, um nível aceitável de proteção não foi obtido em nenhuma das estratégias utilizadas. Outras proteínas interessantes como alvos vacinais são as proteínas LigA e LigB. Ambas as proteínas quando testadas com adjuvante completo de Freund foram capazes de conferir 90 % de proteção (KOIZUMI; WATANABE, 2004). No entanto, essa formulação testada não foi capaz de conferir uma imunidade esterilizante, visto que leptospirose foram recuperadas dos rins de animais sobreviventes. Além disso, o adjuvante utilizado nessas formulações vacinais não é licenciado para uso humano, devido aos sérios efeitos provocados pelo seu uso. Outras formulações que utilizam as proteínas Ligs como antígenos também já foram testadas e apesar de observar 100 % de proteção em alguns casos, uma porcentagem elevada de sobreviventes no grupo controle também foi constatado (FAISAL et al., 2008; FAISAL et al., 2009; PALANIAPPAN et al., 2006; SILVA et al., 2007; YAN et al., 2009). Mais recentemente,

uma porção da LigA foi avaliada em associação a outras 6 proteínas recombinantes e o adjuvante flagelina. Essa formulação foi capaz de promover cerca de 80 % de proteção e também uma redução da colonização renal, porém não foi esterilizante (MONARIS et al., 2015).

O potencial vacinal de algumas proteínas *OmpA-like* também foi avaliado em modelo de desafio animal. Interessante, a proteína Loa22, identificada como o primeiro fator de virulência, foi capaz de conferir proteção parcial (YAN et al., 2010). Proteínas caracterizadas pelo nosso grupo, quando avaliadas quanto à capacidade de proteção, níveis parciais também foram obtidos (ATZINGEN et al., 2010; ATZINGEN et al., 2012). Embora dados de proteção parcial tenham sido obtidos até o momento, novas pesquisas devem ser realizadas para a identificação de antígenos vacinais com potencial para proteção. Assim, com o intuito de identificar novos antígenos vacinais de leptospiros, 3 genes foram selecionados a partir do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. A caracterização funcional das proteínas recombinantes geradas e a avaliação do seu potencial vacinal podem contribuir para um melhor entendimento tanto das leptospiros como da leptospirose.

A presente tese de doutorado tem como objetivo caracterizar três proteínas selecionadas a partir do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e avaliar o seu potencial vacinal em modelo animal. Para melhor compreensão dos resultados, o trabalho foi separado em 5 capítulos:

Capítulo I - Seleção *in silico* de candidatos vacinais e identificação *in vitro* da presença dos genes e seus respectivos transcritos

Capítulo II - Obtenção das formas recombinantes dos candidatos vacinais selecionados

Capítulo III - Expressão e localização celular dos candidatos vacinais selecionados

Capítulo IV - Avaliação e caracterização da interação dos candidatos vacinais selecionados com componentes do hospedeiro

Capítulo V - Avaliação do potencial vacinal dos candidatos selecionados em modelo animal

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições de cultivo e *Leptospira* spp.

As leptospiros foram cultivadas a 28 °C sob condições aeróbias em meio EMJH líquido (Difco®, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) (ELLINGHAUSEN; MCCULLOUGH, 1965; JOHNSON; ROGERS, 1967) com 10% (v/v) de soro de coelho, enriquecido com L-asparagina (m/v: 0,001%), cloreto de magnésio (m/v: 0,001%), peptona (m/v: 0,03%) e extrato de carne (m/v: 0,001%). Como o crescimento das leptospiros é lento, as subculturas são mantidas por cerca de 14 dias antes de serem subcultivadas. Cepas patogênicas atenuadas em cultura da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M20), *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae (RGA), *L. interrogans* sorovar Canicola (Hond Utrecht IV), *L. interrogans* sorovar Pomona (Pomona), *L. interrogans* sorovar Hardjo (Hardjo-prajitno), *L. borgpetersenii* sorovar Whitticomb (Whitticomb), *L. kirschneri* sorovar Cynopteri (3522 CT), *L. kirschneri* sorovar Grippotyphosa (Moskva) e *L. noguchii* sorovar Panama (CZ214) foram utilizadas nesse trabalho. Também foram empregadas cepas virulentas da *L. interrogans* sorovares Copenhageni (Fiocruz L1-130) e Kennewicki (Pomona Fromm – LPF). A cepa saprofítica utilizada foi a *L. biflexa* sorovar Patoc (Patoc 1). A recuperação da virulência é realizada em hamsters e o cultivo obtido a partir do isolamento primário é mantido por até 13 semanas. Tanto as culturas como os ensaios com hamsters são realizados rotineiramente no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo, Brasil.

3.2 Seleção *in silico* dos genes de interesse

Os genes de interesse foram selecionados a partir do genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni, disponível no servidor público: (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>) (NASCIMENTO et al., 2004b). Esses genes foram analisados pelo programa PSORT (<http://www.psort.org/psortb/>) (NAKAI; KANEHISA, 1991) e CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (YU et al., 2006; YU et al., 2010) que tem por objetivo prever em qual compartimento celular essas proteínas hipotéticas são encontradas. A presença de sinal de clivagem ou lipidação foi avaliada com auxílio do programa LipoP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) (JUNCKER et al., 2003), e a sequência correspondente ao peptídeo sinal foi definida com auxílio do software SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). A sequência de aminoácidos correspondente a cada

gene também foi analisada pelos programas SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/help/smart_about.html) (LETUNIC et al., 2006; SCHULTZ et al., 1998) e PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) (SONNHAMMER; EDDY; DURBIN, 1997) para verificar a presença de domínios conservados. Por fim, a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) (ALTSCHUL et al., 1990; ALTSCHUL et al., 1997) foi usada para analisar as similaridades entre as sequências selecionadas com as sequências de outras espécies e soravares de leptospiros disponível no banco de dados.

3.3 Construção de oligonucleotídeos específicos

Para obtenção de produtos de PCR e possibilidade de amplificar os genes de interesse em diferentes espécies de leptospiros, foram desenhados oligonucleotídeos com o auxílio do programa Generunner®, 1994 (Hastings Software, Hastings, Nova York, EUA). Os insertos foram amplificados sem a sequência do peptídeo sinal e foram adicionados sítios de restrição aos *primers*. A sequência de oligonucleotídeo correspondente a cada gene pode ser visualizada na tabela 1. Para realização da PCR em tempo real os oligonucleotídeos foram desenhados pelo programa *primer tools*, tendo como base o genoma da *L.interrogans* sorovar Copenhageni e da *L. biflexa* (tabela 1).

Tabela 1 – Sequência de oligonucleotídeos empregada para amplificação dos genes de interesse

Gene ID	Oligonucleotídeo sintético	TA	Amplicon
LIC13479	F: 5' CTCGAG AGTATAAATCAAAATCCT 3' R: 5' AAGCTT CTAACGACTGATAATCTG 3'	62 °C	1176 pb
LIC10050	F: 5' CTCGAG TCTCAACCTCTACCG 3' R: 5' AAGCTT TCAGAGCTTTCTAAAAC 3'	62 °C	2004 pb
LIC10537	F: 5' CTCGAG TCTTCCTCAAAAAAACT 3' R: 5' AAGCTT TTATTTACTTTTTTTTCAA 3'	64 °C	1914 pb
LIC10537	F: 5' CTCGAG TCTTCCTCAAAAAAACT 3' R: 5' AAGCTT TTATTTACTTTTTTTTCAA 3'	60 °C	1044 pb
Fragmento 1	R: 5' AAGCTT TTAGTTGTGTGATCA 3'		
LIC10537	F: 5' CTCGAG TCATGAAGAGAT 3' R: 5' AAGCTT TTAGTTGTGTGATCA 3'	49 °C	870 pb
Fragmento 2	R: 5' AAGCTT TTATTTACTTTTTTTTCAA 3'		
LIC13479	F: 5' GGCTCATTGCTTTTTTCCCAAG 3' R: 5'AGAGCCGTGAATACGGAAGA 3'	-	148 pb
<i>L.interrogans</i>	R: 5'AGAGCCGTGAATACGGAAGA 3'		
LIC10050	F: 5'GAA CCG AGA TCC AAA GAT CG 3' R: 5'GGA AGA TGG ACA GAC CCA GA 3'	-	148 pb
<i>L.interrogans</i>	R: 5'GGA AGA TGG ACA GAC CCA GA 3'		
LIC10537	F: 5'CTCTGGGCGCATTTCTTTAG 3' R: 5'GGATCAATGGACCAAACCTG 3'	-	145 pb
<i>L.interrogans</i>	R: 5'GGATCAATGGACCAAACCTG 3'		
LIC13479	F: 5' TCCAAGGACCAATCAATTCAG 3' R: 5'GAAAATCCCAGCTACCGTCA 3'	-	150 pb
<i>L.biflexa</i>	R: 5'GAAAATCCCAGCTACCGTCA 3'		
LIC10050	F: 5'GGC AGA CTT CCT CAT CCA TC 3' R: 5'TCT TTG GGA ACA CCC TTC AG 3'	-	150 pb
<i>L.biflexa</i>	R: 5'TCT TTG GGA ACA CCC TTC AG 3'		
LIC10537	F: 5' TTT TGG AGG GGG ACC TTA TC 3' R: 5'ACA GAC TTC CCC TTG CAC AT 3'	-	150 pb
<i>L.biflexa</i>	R: 5'ACA GAC TTC CCC TTG CAC AT 3'		

NOTAS: Gene ID: identificação do gene no genoma *L. interrogans* sorovar Copenhageni; Abreviaturas (em inglês): F, “forward”; R, “reverse”; TA, temperatura de anelamento utilizada; pb, pares de base. As sequências que correspondem aos sítios de restrição *XhoI/HindIII* estão em negrito.

3.4 Extração de DNA genômico das *Leptospira* spp.

O material genético das cepas de leptospiros descritas acima foi extraído. As culturas bacterianas foram crescidas em meio EMHJ por um período aproximado de sete dias (JOHNSON; HARRIS, 1967). Após o crescimento, 3 mL de cultura foram coletados e submetidos ao processo de centrifugação por 2 minutos a 6000 rpm em temperatura ambiente. O *pellet* formado foi ressuspensão em 467 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0) 30 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10 % e 3 µL de 20 mg/mL de proteinase K (Sigma – Aldrich, St. Louis, Mo, EUA). A mistura foi homogeneizada e incubada por 1 hora a 37 °C. Após incubação, um volume igual da solução fenol-clorofórmio 1:1 foi adicionado, e essa mistura foi agitada até que as fases fossem completamente misturadas. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi recuperado. Essa fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo e a extração por fenol-clorofórmio 1:1 foi repetida. Após a recuperação do sobrenadante, foi adicionado 1/10 volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e 0,6 volumes de isopropanol. A solução foi bem misturada e colocada em freezer -20°C por cerca de 1 hora. Após centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos, o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 70 %, e em seguida centrifugado a 11000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O etanol foi desprezado com cuidado e 50 µL de água estéril foram adicionados para solubilizar o DNA.

3.5 Procedimentos de clonagem dos genes selecionados de *L. interrogans* sorovar Copenhageni

Os fragmentos de DNA correspondentes aos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 foram obtidos por PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Os seguintes reagentes foram adicionados para cada reação preparada em um volume final de 50 µL: PCR *buffer* 1x; 0,2 mM desoxirribonucleotídeos (dNTPs); 2mM MgCl₂; 0,5 mM de cada oligonucleotídeo (F e R); 1 U Taq polimerase (Invitrogen) e 100 ng de DNA genômico. A reação foi realizada em termociclador, com desnaturação do DNA a 94 °C por 4 minutos, 35 ciclos de: 94 °C por 50 segundos, temperatura de anelamento por 50 segundos e 72 °C por 2 minutos, finalizando com 72 °C por 7 minutos. A princípio as temperaturas de anelamento utilizadas foram determinadas de acordo com o programa Generunner® (1994). Os fragmentos amplificados sem a sequência do peptídeo sinal foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE (40mM Tris – acetato e 1mM EDTA) e corado com Gel Red™

(Biotium, Inc., Hayward, CA, EUA). Os insertos de interesse foram cuidadosamente recortados do gel e purificados através do kit “*GFxPCR DNA and gel band purification*” (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

Os produtos purificados foram quantificados em espectrofotômetro e inseridos no vetor de clonagem pGEM-T *Easy* (Promega, Prodimol, MG, Brasil), que apresenta promotores T7 e SP6, um gene de resistência à ampicilina e um sítio de múltipla clonagem. Esse vetor comercial é resultante da digestão do vetor pGEM-5Zf (+) com a EcoR V e adição de timidinas em sua extremidade 3', por esse motivo, é utilizado para otimizar as reações de clonagem, visto que essas timidinas adicionadas facilitam a ligação à produtos de PCR que possuem uma adenina na extremidade 3', adicionada pela atividade transferase terminal da *Taq* polimerase. Assim, a reação de ligação foi realizada segundo o fabricante e os produtos de ligação foram introduzidos em bactérias *E. coli* DH5 α TM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) competentes (HANAHAN, 1983). Foram utilizados 5 μ L do produto de ligação para 50 μ L de bactérias competentes, que foram incubadas por 30 minutos em banho de gelo e, em seguida, submetidas a um choque térmico, por 2 minutos a 42 °C. Após o choque térmico, as amostras foram mantidas em banho de gelo por mais 5 minutos. Para sua recuperação, foram acrescentados 350 μ L de meio de cultura Luria Bertani – LB (0,5 % extrato de levedura, 1 % triptona, 1 % NaCl) e as amostras foram incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação. Após o processo de recuperação, as amostras foram plaqueadas em meio LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina, 100 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) e 50 mg/mL de X-gal, posteriormente, as placas foram incubadas 16 h a 37 °C. Outro ponto interessante no pGEM-T *Easy* está na facilidade obtida durante o processo de seleção dos clones de interesse, uma vez que a presença do inserto interrompe a região codificadora da enzima β -galactosidase, a qual é capaz de degradar o substrato cromogênico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo). Assim, a seleção de clones recombinantes em placas de cultura se dá pela diferenciação azul/branco, uma vez que colônias positivas para o inserto não conseguem degradar esse substrato e assim são visualizadas em branco. As colônias brancas selecionadas foram inoculadas em meio LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina e foram incubadas por 16 h a 37 °C sob agitação. Para obtenção do DNA plasmidial (pGEM-T *Easy* contendo o inserto de interesse) utilizou-se o kit “*Plasmid prepmini spin*” (GE Healthcare) seguindo as orientações do fabricante. A presença dos fragmentos foi analisada por eletroforese em gel de agarose após a digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição correspondentes.

Após confirmação da clonagem, os fragmentos foram removidos da construção pGEM-T *Easy*/inserto e inseridos no vetor de expressão pAE (RAMOS et al., 2004). Esse vetor foi formado a partir de modificações dos vetores pRSETA (Invitrogen) e pET3-His. Ele é constituído pelo promotor do fago T7, por isso a expressão das proteínas recombinantes só ocorre na presença da enzima T7 RNA polimerase. Possui uma sequência codificadora para 6 resíduos de histidina logo após o códon de iniciação, um sítio de múltipla clonagem e um gene de resistência à ampicilina. Assim, a ligação dos insertos nesse vetor foi realizada em uma reação contendo uma proporção molar de 5:1 (inserto: vetor). Posteriormente essa reação foi incubada a uma temperatura de 22 °C por 50 minutos, como recomendado pelo fabricante da enzima T4 DNA ligase (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*, MA, USA). Os produtos de ligação foram usados para transformar *E. coli* DH5 α . As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina e incubadas a 37 °C por 16 h. No dia seguinte, as colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio líquido LB com 100 μ g/mL de ampicilina e novamente incubadas a 37 °C por 16 h. Após o crescimento bacteriano, 300 μ L de cultura foram centrifugados a 12000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em 50 μ L de água deionizada. Nessas amostras foram adicionados 20 μ L de tampão de carregamento 10 x (0,19 % azul de bromofenol, 0,425 xileno cianol e 50 % glicerol) e 28 μ L de solução fenol-clorofórmio 1:1. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com o auxílio do *vortex* e centrifugadas a 12000 rpm por 3 minutos, a fase superior foi analisada por eletroforese de gel de agarose 1 %. Os clones que apresentaram alteração de tamanho comparado com o vetor vazio foram selecionados e tiveram seus plasmídeos purificados para avaliação da presença dos insertos de interesse. A obtenção do DNA plasmidial (pAE/inserto) e a verificação dos insertos foi feita conforme descrito acima para o vetor pGEM-T *Easy*.

3.6 Sequenciamento dos clones

O DNA plasmidial referente aos clones positivos foi submetido ao sequenciamento pelo método da terminação de cadeia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) em sequenciador automático ABI PRISM® 3100 *Genetic Analyzer* (PE *Applied Biosystems*, Foster city, CA) para verificação dos insertos clonados. Esse método em preta o uso de 2', 3' didesoxirribonucleotídeos (ddNTPs) marcados por fluoróforos que interrompem a amplificação aleatoriamente, pois impedem a formação da ligação fosfodiéster com o

nucleotídeo adjacente e possibilitam a leitura automatizada por meio de um feixe de laser gerando um cromatograma. A reação de amplificação dos fragmentos a serem sequenciados foi realizada num volume final de 20 µL contendo 500 ng de DNA, 3,2 pmoles dos oligonucleotídeos T7 e pAER e 2 µl do tampão *BigDye®* (*Applied Biosystems*) que contém ddNTPs marcados com corantes fluorescentes específicos, além de dNTPs e Taq DNA polimerase. A reação foi realizada em termociclador seguindo 40 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 52 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 minutos. Em seguida, a mistura foi precipitada com isopropanol 75 % e centrifugada a 11500 rpm por 50 minutos. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70 %, seco a vácuo e ressuscitado em 15 µL de formamida HiDi (*Applied Biosystems*). Os cromatogramas obtidos foram analisados com o auxílio dos programas:

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

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

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

Para extração do RNA, foram utilizados 20 mL de cultura das cepas descritas anteriormente. Assim, após 7 dias de cultivo, as leptospiros foram centrifugadas por 30 minutos a 6000 rpm em temperatura de 4 °C. O precipitado foi ressuscitado em 2 mL de Trizol (Invitrogen) e centrifugado novamente por 10 minutos a 12000 rpm (4 °C). O sobrenadante foi transferido para tubos novos e 200 µL de clorofórmio por mL de Trizol foi adicionado. Em seguida, os tubos foram agitados por 15 segundos e incubados durante 2 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm a 4 °C. A fase aquosa (superior) foi transferida para novos tubos e 500 µL de isopropanol por mL de Trizol foi adicionado. Após inversão dos tubos e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, uma nova centrifugação foi realizada durante 10 minutos a 12000 rpm (4 °C). O sobrenadante foi descartado e 1 mL de 75 % etanol foi adicionado. O tubo foi invertido 2 x e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm (4 °C). O sobrenadante foi descartado e seco por 5 minutos. Por fim, os *pellets* foram ressuscitados com 40 µL de H₂O-RNase free (DEPC – Invitrogen). O RNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro e posteriormente, 2 µg de RNA foram tratados com a enzima Dnase I utilizando o kit *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen) e tampão fornecido pelo fabricante. Após incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, 2 µL de 2,5 mM EDTA foi adicionado e incubado à 65 °C

por 10 minutos. As amostras foram divididas em duas frações para realização da transcrição reversa.

A RT-PCR foi realizada utilizando o kit “*SuperScript® III First Strand*” (Invitrogen). Em cada amostra foi adicionado 25 ng de hexâmeros randômicos e 1 mM dNTPmix. A incubação foi feita por 5 minutos a 65 °C, e logo transferida para o gelo por 1 minuto. Em seguida foi adicionado 10 µL do mix RT+ (com enzima transcriptase reversa) ou RT- (sem enzima transcriptase reversa) contendo os seguintes reagentes: 5 mM de MgCl₂, 10mM de DTT, 40 U de RNase OUT, e 200U *SuperScript III RT* (RT+) ou água (RT-) e tampão fornecido pelo fabricante. Um ciclo de amplificação foi realizado para obter o cDNA: 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 50 °C, 5 minutos a 85 °C, finalizando em 4 °C. Por fim, foi adicionado 1 µL RNase H durante 20 minutos a 37 °C, e em seguida os tubos foram armazenados a -20 °C.

3.8 Análise da presença dos genes e respectivos transcritos entre diferentes cepas de *Leptospira*

Para verificar a presença dos genes selecionados nas diferentes espécies de leptospiros, os mesmos oligonucleotídeos utilizados na etapa de clonagem (tabela 1) foram utilizados. Os fragmentos de DNA correspondentes aos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 nas diferentes cepas foram obtidos por PCR como descrito acima.

3.9 Real Time RT-PCR (RT-qPCR)

A RT-qPCR foi realizada no aparelho “*Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System*” utilizando o corante SYBR *Green I* para detectar a formação dos produtos da reação. Como o SYBR *Green I* se liga a qualquer DNA dupla-fita, padronizações foram realizadas, tanto nas concentrações de oligonucleotídeos como nas concentrações de cDNA para obtenção de resultados confiáveis. Uma concentração ótima de oligonucleotídeo consiste na sua quantidade mínima capaz de produzir o mais baixo C_T (ciclo *threshold*) e mais elevado ΔRn (fluorescência), sem que ocorram ligações inespecíficas e formação de dímeros (VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). Para determinar a melhor concentração a ser utilizada dos *primers*, uma reação com 50 ng de DNA genômico e três concentrações distintas de cada oligonucleotídeo (300, 150 e 50 nM) foi realizada conforme indicado pela *Applied Biosystems*. Assim, a concentração de 300 nM foi determinada para uso. É importante realizar

a padronização da quantidade de cDNA, porque garante que alvos com baixos níveis de expressão possam ser detectados. A padronização foi feita por meio de curvas padrão, que permitem também calcular a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos, necessária para validação do método de quantificação relativa C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$). Foram feitas diluições de 5 logs utilizando cDNA da *L.interrogans* sorovar Copenhageni (M20). Os valores de C_T obtidos para cada gene foram analisados por meio de um gráfico de regressão linear e a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos foi calculada com base na fórmula: $E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$, em que E é a eficiência da amplificação e slope é o valor da inclinação da reta gerada pelo gráfico. Diferenças de até 10 % entre as eficiências de amplificação dos oligonucleotídeos foram consideradas para que o método $\Delta\Delta C_T$ fosse utilizado. Os valores de C_T também permitiram avaliar a precisão do ensaio (desvio padrão de $C_T < 0,3$ e $R^2 > 0,99$). A reação foi preparada em triplicata em placas ópticas de 96 poços, com volume final de 25 μl por poço contendo 25 ng de cDNA, 300 nM de cada *primer* e 12,5 μl de SYBR® *Green Master Mix* (Applied Biosystems), conforme recomendado. Para o controle negativo, todos os reagentes foram utilizados, exceto o cDNA (NTC – *no template control*). As seguintes condições foram aplicadas: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 30 segundos. Curva de dissociação foi obtida após cada reação por meio de aquecimento dos produtos da PCR a 60 °C e 95 °C, a fim de garantir a especificidade dos produtos da reação. A comparação da expressão de cada gene foi realizada pelo método de quantificação relativa $\Delta\Delta C_T$, que utiliza a fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (*fold change* relativo) para comparar o nível de expressão em diferentes amostras.

3.10 Expressão das proteínas recombinantes

Diferentes linhagens de *E. coli* modificadas geneticamente foram empregadas nos ensaios de expressão. As linhagens utilizadas apresentam as seguintes características: BL21 SI (*Salt Induced*) (Invitrogen), possui o gene da T7 RNA polimerase integrado ao genoma sob controle do promotor *proU* que é induzido por NaCl (BHANDARI; GOWRISHANKAR, 1997). BL21 (DE3) (Invitrogen) também possui o gene da T7 RNA polimerase, porém a expressão é controlada pelo promotor *lac UV5*, o qual é induzido por IPTG (STUDIER et al., 1990). BL21 Star™(DE3) pLysS (Invitrogen) possui um plasmídeo pLysS que expressa a enzima T7 lisozima, um inibidor da polimerase T7, reduzindo a expressão basal da proteína na ausência de indutores (DAVANLOO et al., 1984). A linhagem C43 (DE3) (Avidis, Saint-

Beazure, França) contém mutações genéticas que a torna fenotipicamente estável e, por isso, são indicadas para expressão de proteínas tóxicas (MIROUX; WALKER, 1996). Essas linhagens tornadas competentes foram transformadas com o plasmídeo recombinante e cultivadas por 16 h. No caso da linhagem *E. coli* BL21 SI, o cultivo foi realizado em meio 2YT/ON (1 % extrato de levedura, 1,6 % triptona; sem adição de NaCl) contendo 100 µg/mL de ampicilina, e a incubação foi feita à 30 °C por 16 h sob agitação. As culturas saturadas foram diluídas (1:100) em um novo meio, incubadas e monitoradas periodicamente por meio da leitura em espectrofotômetro até atingir uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 0,6 e 0,8. Às culturas que atingiram a DO foram adicionados 5, 50 e 500 mM de NaCl, novamente as culturas foram incubadas, sendo que a cada hora após a indução uma alíquota foi retirada do meio, para posterior análise. Em relação às outras linhagens, o procedimento realizado foi semelhante, porém o meio utilizado foi o LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, com exceção da cepa BL21 StarTM(DE3)pLysS que foi adicionado além de ampicilina, cloranfenicol ao meio. Essas culturas foram mantidas a 37 °C e a indução foram realizadas com diferentes concentrações de IPTG (0,01; 0,1 e 1 mM). Após o período de 3 horas de indução, as culturas foram centrifugadas (5000 rpm/15 minutos/4 °C) e a massa bacteriana obtida foi ressuspensa em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 200 µg/mL lisozima; 2mM PMSF (*Phenylmethyilsulfonyl fluoride*) e 1% Triton X-100) para que fosse lisada por sonicação a 60 Hz. O lisado foi centrifugado e o pellet formado foi ressuspensa em tampão de desnaturação (10 mM Tris-HCl pH8,0; 150 mM NaCl; 8 M ureia). Alíquotas do sobrenadante e do *pellet* solubilizado foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Após determinar a cepa e a condição mais favorável à expressão das proteínas, esse procedimento foi realizado em maior escala para posterior purificação destas proteínas recombinantes.

3.11 Purificação e diálise das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade ao metal empregando a resina *Chelating Sepharose* (GE Healthcare) previamente carregada com 300 mM NiSO₄. A purificação foi realizada a partir de 1L de cultura da cepa BL21 StarTM(DE3) pLysS, cujo *pellet* formado após a centrifugação foi ressuspensa em 50 mL de tampão de desnaturação por cerca de 16 horas para garantir a total solubilização. A purificação das proteínas LIC13479 e LIC10050 foi realizada pelo método de renaturação (*refolding*) na

coluna, no qual a proteína recombinante é adsorvida à coluna em sua forma desnaturada, e então soluções contendo concentrações decrescentes de ureia são passadas na coluna (50 mL) para remoção do agente desnaturante e consequente renaturação das proteínas. Assim, a resina previamente carregada com NiSO₄ foi equilibrada com tampão contendo 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl e carregada com 50 mL da amostra. Em seguida, o mesmo tampão contendo concentrações decrescentes de ureia (6 M, 4 M, 2 M, 1 M e 0 M) foram passadas na coluna. Lavagens com o mesmo tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (5 mM, 20 mM, 40 mM e 60 mM) foram realizadas. Por fim, a proteína LIC13479 e LIC10050 foram eluídas com a concentração final de 1 M de imidazol. As frações obtidas foram coletadas e analisadas em gel de SDS-PAGE. As frações em que as proteínas recombinantes estavam presentes foram dialisadas em tampão PBS, sendo realizadas quatro trocas do tampão de diálise. Em relação à purificação dos fragmentos recombinantes gerados a partir da LIC10537, outra estratégia de purificação foi realizada. O processo foi feito também sob condições desnaturantes, porém o processo de renaturação foi feito durante a diálise após a eluição da proteína em tampão contendo 20 mM ou 100 mM de imidazol. A diálise foi realizada lentamente com concentrações decrescentes de ureia. A concentração das proteínas recombinantes foi estimada em SDS-PAGE por comparação com massas conhecidas de BSA (*Bovine Serum Albumin*), utilizando análise densitométrica do *software Gel Quant* (2003).

3.12 Dicroísmo circular (CD)

Amostras das proteínas recombinantes foram dialisadas em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 que é apropriado para a análise por não conter íons cloro, e assim não interfere na leitura do equipamento. Os espectros de CD foram expressos em termos de elipticidade molar residual: $[\Phi] = \Phi \text{ (mdeg)} / 10 \times C(M) \times I \text{ (cm)}$, onde Φ é elipticidade, C é a concentração da proteína e I é o caminho óptico. As medições de espectroscopia circular foram feitas a 20 °C em um espectropolarímetro Jasco J-810 (*Japan Spectroscopic*, Tóquio, Japão). O espectro foi medido usando uma cubeta de 1 mm de caminho óptico em intervalos de 0,5 nm/seg, e apresentado como uma média de cinco leituras em intervalos de 190 a 260 nm. Os espectros gerados foram submetidos para análise no programa CAPITO, que calcula o conteúdo de estrutura secundária da proteína a partir dos dados experimentais de elipticidade (WIEDEMANN; BELLSTEDT; GORLACH, 2013).

3.13 Detecção das proteínas por *Western blotting*

Os extratos proteicos, as frações solúveis, insolúveis e as proteínas purificadas foram separados por SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose (*Hybond ECL*, *GE Healthcare*) em sistema semiúmido por 1 hora a 0,8 mA por cm² em tampão de transferência (Tris-Glicina acrescido de 1,85 % de SDS). A eficiência da transferência foi avaliada por coloração de *Ponceau S* (*Sigma-Aldrich*). As membranas foram incubadas por 16 h a 4 °C com solução de bloqueio composta por 10 mL de tampão fosfato-salina acrescido de 0,05 % Tween-20 (PBS-T) e 10 % de leite desnatado (PBS-T/Leite). No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 x com PBS-T e incubadas por 2 h em temperatura ambiente com anticorpo monoclonal anti-his (*Sigma-Aldrich*) diluído 1:5000. As proteínas recombinantes também foram detectadas com anticorpos policlonais produzidos em camundongos contra cada proteína. Nesse caso, a diluição do anticorpo utilizado foi a diluição dos soros correspondente a uma DO_{492 nm} de 1. As seguintes diluições foram utilizadas: anti-LIC13479 (1:800), anti-LIC10050 (1:1600) e fragmentos da LIC10537 (1:600). Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 x com PBS-T e incubadas por 1 h em temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em coelho conjugado com peroxidase (*Sigma-Aldrich*) na diluição 1:3000. As membranas foram lavadas 3x com PBS-T, e as proteínas foram detectadas utilizando kit *ECL Western Blotting Detection Reagents* (*GE Healthcare*). A quimiluminescência da reação da peroxidase foi detectada com auxílio do *software Carestream Molecular Imaging* (*Carestream Health, Inc.*, Rochester, Nova York, EUA) acoplado ao aparelho Gel Logic 2200PRO.

Para a detecção das proteínas nativas correspondentes aos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 em diferentes sorovares de leptospiros, extratos totais de espécies e sorovares de leptospiros foram obtidos. As culturas foram centrifugadas por 20 minutos a 6000 rpm, lavadas 3 x com PBS acrescido de 5 mM de MgCl₂, e centrifugadas por mais 10 minutos a 6000 rpm. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 200 µl de PBS acrescido de 9 % SDS e separados por SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose. As etapas para detecção das proteínas foram realizadas conforme descrito acima, com exceção que os anticorpos contra cada proteína foram utilizados na diluição de 1:50.

3.14 Ensaio de imunofluorescência

A localização celular das proteínas foi analisada por imunofluorescência. Para esse experimento cultura de leptospiros patogênicas atenuadas (M20) e virulenta (L1-130) e leptospiros saprofíticas (Patoc) foram centrifugadas a 6000 rpm por 15 minutos. O sedimento bacteriano foi lavado 3 vezes com PBS contendo 50 mM de NaCl (PBS - *low salt* – PBS *ls*) e após centrifugação por mais 15 minutos à 6000 rpm, foi ressuspensionado em uma solução de 200 µL contendo 2 % de paraformaldeído e incubado por 40 minutos a 30 °C. Em seguida, as amostras foram bloqueadas por 90 minutos com 200 µL de PBS *ls* contendo 5 % de BSA. Após a incubação, as amostras foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 6000 rpm, e o *pellet* resultante foi ressuspensionado em uma solução de PBS *ls* com 3 % de BSA contendo antissoro gerado contra LipL21 (proteína de membrana externa), DnaK (proteína citoplasmática) ou contra as proteínas recombinantes na diluição de 1:50 por 2 h a 30 °C. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS *ls* mais BSA 3 % e incubadas por 1h com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em cabra e conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC, *Sigma-Aldrich*) diluído 1:50 em uma solução de PBS *ls* com 3 % de BSA. Após esse período, a solução foi centrifugada e o *pellet* foi lavado duas vezes com PBS *ls* 3 % de BSA, e 1 x com água destilada. As bactérias foram ressuspensionadas em 50 µL de PBS *ls* contendo 0,03 µg de iodeto de propídeo (IP – *Sigma-Aldrich*) / µL de *antifade*. As imagens foram captadas em microscópio de imunofluorescência confocal do modelo LSM 510 META (Carl Zeiss Inc., Alemanha), alocado no Departamento de Parasitologia do Instituto Butantan (São Paulo, SP). Foi utilizado aumento de 600 X (FITC, excitação 488 nm, emissão 500-550 nm e Iodeto de propídeo, excitação 543 nm, emissão 612-619 nm).

3.15 Fracionamento celular por Triton X-114

A localização celular das proteínas foi determinada por fracionamento celular e separação de fases. Para isso, cultura de leptospiros foi crescida em meio EMJH até atingir aproximadamente uma densidade de 10^8 – 10^9 leptospiros por mL. As bactérias foram recuperadas por centrifugação a 6000 rpm durante 20 minutos e o *pellet* resultante foi lavado 3 x com PBS pH 7,4 acrescido com 5 mM de $MgCl_2$. Em seguida, as células bacterianas foram ressuspensionadas em 10 mM de Tris-HCl e 2 mM de EDTA, pH 7,4 mais 1 % de uma

solução 10 % de triton X-114 gelada (*Sigma-Aldrich*). A solução foi gentilmente misturada e incubada a 4 °C por 45 minutos em plataforma giratória. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4 °C e 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado CaCl₂ a uma concentração final de 20 mM. Essa fração foi mantida a 4°C até o procedimento de separação de fases ser realizado. O *pellet* foi ressuspensionado em tampão SDS-PAGE para posterior análise, e essa fração insolúvel ao detergente corresponde ao cilindro protoplasmático (CP). Para separação de fases, 10 % de triton X-114 foi adicionado em concentração final de 2 % na fração solúvel ao detergente e a separação foi feita por aquecimento a 37 °C por 10 minutos, seguido da centrifugação a 3000 rpm. Essa centrifugação permite a separação da fase aquosa (AQ) “pobre em detergente” da fase hidrofóbica (DET) “rica em detergente”. A fase AQ é composta por proteínas do periplasma, enquanto lipoproteínas de membrana externa e proteínas transmembranas são encontradas na fase DET. Ambas as fases foram lavadas 4 x da seguinte maneira: Na fase aquosa foi adicionado 10 % de triton X-114 na concentração final de 2% em banho de gelo, seguido pelo aquecimento a 37 °C e centrifugação em 6000 rpm a temperatura ambiente. A fase DET também foi mantida em banho de gelo e diluída com 9 partes do tampão Tris-HCl com EDTA, aquecida a 37 °C e centrifugadas conforme descrito acima. As frações AQ e DET foram precipitadas com acetona e ressuspensionadas com tampão SDS-PAGE para serem analisadas posteriormente. A detecção das proteínas nativas nas respectivas frações foi realizada de acordo como descrito acima. Como controle foram utilizados antissoro contra a proteína de membrana externa OmpL1 na diluição de 1:800, e a proteína citoplasmática DnaK 1:500. Os antissoros respectivo a cada proteína foram utilizados na diluição de 1:50.

3.16 ELISA para detecção das proteínas nas leptospiros intacta

Foram utilizados 10 mL de cultura das leptospiros patogênicas atenuadas (M20), virulentas (L1-130) e da leptospira não patogênica (Patoc). A concentração de bactérias foi determinada por meio de contagem em câmara *Petroff-Hausser* e utilizada aproximadamente 10⁸ células/mL para cada tratamento. As bactérias foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos e o *pellet* bacteriano foi lavado com tampão PBS *ls*. Em placa de ELISA (*Costar®High binding, Corning*) foram imobilizadas 10⁷ bactérias por poço durante 16 horas a 4 °C. No dia seguinte, a placa foi lavada 3 vezes utilizando PBS *ls*, e posteriormente foi bloqueada com solução contendo PBS *ls* mais 10% de leite desnatado por 2 horas a 37 °C.

Após o bloqueio, a placa foi lavada 3 vezes com PBS *ls* e, posteriormente, foram adicionados os respectivos antissoros contra cada proteína rLIC13479 (1:50), rLIC10050 (1:50) e DnaK (1:500) e a placa foi incubada por mais 2 horas a 37 °C. Novamente a placa foi lavada 3 vezes e incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase por 1 hora a 37 °C. Após a incubação a placa foi novamente lavada, e a detecção da ligação foi demonstrada indiretamente pela reação da peroxidase com o substrato OPD (cloridrato de o-fenilenodiamina, *Sigma-Aldrich*), diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 (1 mg/mL) contendo 1 µL/mL H₂O₂ (100 µL/poço). A reação foi interrompida após 15 minutos com 50 µL/poço de H₂SO₄ 4 N. A intensidade da ligação foi analisada por espectrofotometria a 492 nm (DO_{492nm}). A análise estatística foi feita por comparação das médias dos grupos por ANOVA seguido do teste de Tukey, onde $p < 0,05$ foi considerado significativamente estatístico.

3.17 Detecção de anticorpos IgG em soros de humanos

A detecção de anticorpos IgG no soro de pacientes diagnosticados com leptospirose ou com HIV, malária, dengue e Chagas foi realizado por ELISA. As proteínas recombinantes foram imobilizadas em placa de microdiluição (250 ng de proteína por poço diluída em tampão carbonato 0,1 M pH 9,6). As placas foram incubadas por 16 h a 4 °C, e no dia seguinte foram lavadas 3 x com PBS-T, bloqueadas com 200 µL/poço de PBS-T/Leite e incubadas por 2 h a 37 °C. Os soros humanos foram empregados na diluição de 1:100 e os mesmos foram adsorvidos por 1 h em extrato de *E. coli* 10 % para remover anticorpos inespecíficos contra proteínas de *E. coli*. Em seguida, os soros foram transferidos para placa de ELISA para interação com as proteínas recombinantes, por mais 1 h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 x com PBS-T e 50 µL/poço da solução de bloqueio contendo o anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com peroxidase (*Sigma-Aldrich*) na diluição de 1:3000 foi utilizado. A revelação foi feita da mesma maneira como descrito acima a 492 nm. A reatividade de cada soro foi realizada em duplicata e os valores foram expressos como a média dos valores de absorbância. Para a determinação da frequência de pacientes positivos para a presença de anticorpos, foi utilizado como limiar o valor de corte (*cutoff value*), o qual foi baseado na densidade óptica de um *pool* de soro comercial (*Sigma-Aldrich*) de indivíduos sadios. Assim, o valor do *cutoff* foi calculado como a média dos valores de absorbância apresentados pelos indivíduos somados a três vezes o desvio padrão.

Valores acima do *cutoff* foram considerados positivos. Os soros de pacientes diagnosticados com leptospirose pertencem a uma soroteca do Instituto Adolfo Lutz Central e da região de Santos e foram cedidos gentilmente pela Dra. Eliete C. Romero e Ivy de Jesus Alves, respectivamente. Amostras de soros de pacientes diagnosticados com doenças febris não relacionadas a leptospirose foram obtidas da coleção de soros do Laboratório de Imunoepidemiologia, SUCEN, SP, Brasil e foram cedidos pela Dra. Karin Kirchgatter.

3.18 Componentes biológicos

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

3.19 Ensaio de adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular e plasma

As macromoléculas empregadas nos estudos de adesão foram diluídas em PBS 1x e 1 µg por poço foram adsorvidas em placas de ELISA e incubadas por 16 h a 4 °C para imobilização. Após esse período, as placas foram lavadas 3 x com PBS-T e bloqueadas com 200 µL/poço de PBS-T/Leite por 2 horas a 37 °C. A solução de bloqueio foi descartada e as placas foram novamente lavadas. Foi adicionado 1 µg de cada proteína recombinante em 100 µL de PBS 1 x, a fim de garantir o máximo de especificidade às reações. As placas foram incubadas por 2 h a 37 °C e posteriormente foram lavadas. A detecção das proteínas recombinantes ligadas aos componentes foi feita com o *pool* de soro policlonal específico para cada proteína recombinante, empregado na mesma diluição descrita para detectar as proteínas por *Western blotting*, aquela diluição que apresentou DO_{492nm} igual a 1 nos experimentos de titulação. As placas foram incubadas por 2 h a 37 °C, novamente lavadas e adicionados 100 µL por poço do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:3000 por 1 h a 37 °C. A reação foi revelada com substrato OPD como descrito anteriormente. Para confirmação da ligação, o mesmo experimento foi

feito e a reatividade foi avaliada com anticorpo monoclonal anti-His conjugado com peroxidase. Esse experimento foi realizado em triplicata para cada componente, e a atividade basal foi avaliada em um poço pela ausência de proteína. Para análise estatística a média dos valores de absorbância de cada componente foi comparada com a média apresentada pelos controles negativos por meio do teste *t-Student*. O p-valor apresentado refere-se ao controle negativo BSA e fetuína e foi considerado significativo um p-valor abaixo de 0,05%.

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

Para aqueles componentes aos quais foi verificada ligação significativa das proteínas recombinantes, foi realizada uma curva de dose-resposta para verificar a afinidade de ligação. Para tal, as placas de microdiluição foram imobilizadas com 1 µg de cada componente ou BSA, como controle negativo. As placas foram incubadas por 16 h a 4 °C e no dia seguinte as placas foram lavadas e bloqueadas conforme descrito acima. Após o bloqueio, foram adicionadas concentrações crescentes de cada proteína recombinante diluídas em PBS 1 x, e a reação prosseguiu como descrito no ensaio de adesão. Os valores de absorbância obtidos nas diferentes concentrações foram utilizados para calcular a constante de dissociação (K_D) de acordo com o método anteriormente descrito por Linet al. (2009), com base na equação $K_D = (A_{max} \cdot [proteína] / A) - [proteína]$, na qual A é a absorbância em uma determinada concentração da proteína, A_{max} é a absorbância máxima para o leitor de placas de ELISA, que é obtida na saturação da ligação, [proteína] é a concentração de proteína e K_D é a constante de dissociação do equilíbrio para uma dada absorbância em uma dada concentração de proteína.

3.21 Ensaio de bloqueio da ligação pela incubação com antissoro anti-proteína recombinante

Foi verificado o efeito dos anticorpos contra cada proteína recombinante na ligação aos componentes de maneira dose-dependente. Assim, 1 µg de cada componente foi imobilizado em placa de microdiluição por 16 h a 4 °C. As placas foram lavadas e bloqueadas como descrito acima e após esse período as proteínas recombinantes foram incubadas por 2 h a 37 °C com o respectivo antissoro diluído 1:50 até 1:400. Soros de animais imunizados com PBS foram usados como controle negativo de bloqueio da ligação. A interação das proteínas recombinantes foi detectada com anticorpo monoclonal anti-his conjugado a peroxidase

(*Sigma-Aldrich*). A revelação foi feita como descrita nos experimentos acima. Para análises estatísticas, a média dos valores de absorbância de cada tratamento foi comparada a média das proteínas não tratadas com anticorpo, pelo teste *t-Student*. Um p-valor menor que 5 % foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados foram expressos em porcentagem de ligação.

3.22 Ensaio de inibição da ligação pela desnaturação térmica das proteínas recombinantes

Para verificar o efeito da desnaturação das proteínas recombinantes na interação aos componentes, as proteínas (10 µg/mL) foram submetidas à temperatura de 100 °C por 10 minutos. Em seguida, essas proteínas foram incubadas em placas de microdiluição, onde os componentes foram previamente imobilizados. A detecção da ligação foi realizada conforme descrito para os ensaios de adesão. Os resultados foram expressos em porcentagem de ligação e a média dos valores de absorbância obtidos pela ligação das proteínas desnaturadas foi comparada à média dos valores de absorbância obtida pela ligação das proteínas não desnaturadas, pelo teste *t-Student*. Um p-valor menor que 5 % foi considerado estatisticamente significativo.

3.23 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes à laminina

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

3.24 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio

Para avaliar a importância dos resíduos de lisina na interação das proteínas recombinantes com o plasminogênio, as proteínas recombinantes foram diluídas em 10 µg/mL em tampão contendo concentrações de 2 e 20 mM do ácido-6-aminocaproíco (ACA – *Sigma-Aldrich*). As soluções foram adicionadas aos poços nos quais o plasminogênio havia sido imobilizado. A interação das proteínas recombinantes com PLG na presença de ACA foi detectada com o antissoro específico para cada proteína recombinante, conforme descrito acima. Para as análises estatísticas, teste t- *Student* foi utilizado para comparar a média dos valores de absorbância obtidas pelas proteínas incubadas com ACA e a média dos valores de absorbância obtidos pela ligação das proteínas na situação onde não havia o competidor. Um p-valor menor que 5 % foi considerado estatisticamente significativo.

3.25 Ensaio de atividade enzimática da plasmina

Este experimento foi feito para verificar se o plasminogênio ligado às proteínas recombinantes consegue ser convertido à sua forma enzimaticamente ativa, a plasmina. Para tanto, o procedimento foi realizado conforme proposto por Vieira et al. (2009). Em resumo, as placas de ELISA foram incubadas com 1 µg de cada proteína recombinante por poço ou BSA, empregado como controle negativo. Após a incubação por 16 h a 4 °C, processo de lavagem e bloqueio com PBS-T/Leite por 2 h a 37 °C, foi adicionado 1 µg de plasminogênio por poço para permitir a interação com as proteínas recombinantes. Em seguida, as placas foram lavadas e a cada poço 4 ng de ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA – *Sigma-Aldrich*) e 0,4 nM do substrato cromogênico para plasmina (*D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride*– *Sigma-Aldrich*). Foram incluídos controles nos qual um dos componentes foi omitido (Plasminogênio, uPA ou substrato). As placas foram incubadas por 16 h a 37 °C e a degradação do substrato foi medida por meio de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm. Para as análises estatísticas, teste t- *Student* foi utilizado para comparar a média dos valores de absorbância obtida para o tratamento completo com a média dos valores de absorbância obtido pela com BSA. Um p-valor menor que 5 % foi considerado estatisticamente significativo.

3.26 Interferência entre os componentes na ligação às proteínas recombinantes

Placas de microdiluição foram tratadas com 1 µg/poço de proteína recombinante por 16 h a 4 °C. No dia seguinte, após o processo de lavagem as placas foram bloqueadas por 2 h a 37 °C, novamente as placas foram lavadas e incubadas com 1µg/poço de um componente juntamente com massas crescentes (0 - 1 µg) de outro componente, o qual deseja verificar a interferência. A reação foi incubada por 2 h a 37 °C e a detecção da interação foi feita com anticorpos que reconhecem especificamente os componentes imobilizados na concentração fixa, seguido do uso de anticorpos secundários IgG conjugado a peroxidase: anticabra (1:20000), anticoelho e antimouse (1:3000). A reação foi revelada com OPD como já descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em porcentagem de ligação. Para as análises estatísticas, os valores de absorbância obtidos nas incubações com diferentes massas do competidor foram comparados aos valores obtidos na situação em que o componente competidor foi omitido (0 µg), pelo teste t-Student. Um p-valor menor que 5 % foi considerado estatisticamente significativo.

3.27 Ensaio de inibição da ligação das leptospiros vivas ao componente

Para verificar se as proteínas recombinantes ligadas aos componentes são capazes de reduzir a interação destes com as leptospiros, os componentes foram imobilizados em placa de ELISA por 16 h a 37 °C. No dia seguinte, as placas foram lavadas e bloqueadas com PBS-T/Leite. Após o bloqueio, concentrações crescentes das proteínas recombinantes (0 - 5 µg) foram adicionadas por poço. As placas foram incubadas por 2 h a 37 °C e, em seguida, uma solução de 100 µL contendo 10⁸ leptospiros/mL foi adicionada e a placa foi incubada por mais 2 h a 37 °C. A detecção das leptospiros foi realizada de modo indireto pela incubação com o antissoro anti-LipL32 (1:1000), por ser a proteína majoritária da membrana externa das leptospiros. Em seguida, foi incubado anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:3000) e a reação foi revelada como já descrito. Para as análises estatísticas, foi feita uma comparação entre os valores de absorbância obtidos onde o componente foi incubado com a proteína recombinante à situação na qual não houve incubação, ou seja, o máximo de ligação das leptospiros ao componente, pelo teste t-Student. Um p-valor menor que 5 % foi considerado estatisticamente significativo.

3.28 Imunização de camundongos com as proteínas recombinantes

Cinco camundongos BALB/c fêmeas (6 a 8 semanas) foram imunizados com 10 µg de cada proteína recombinante associada aos adjuvantes hidróxido de alumínio (2 % *Alhydrogel*®, *Brenntag Biosector*, Frederikssund, Dinamarca) na concentração final de 12 % ou Monofosforil lipídeo A derivado de *Bordetella pertussis* (MPLA - Instituto Butantan, São Paulo, Brasil) na concentração de 10 µg por animal. Foram realizadas três imunizações por via subcutânea, em intervalos de 15 dias. Antes de cada dose, os animais foram sangrados via plexo retro-orbital. O sangue coletado foi incubado a 37 °C por 30 minutos, seguido da incubação a 4 °C por mais 30 minutos. Por fim, as amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 6000 rpm, os soros separados foram coletados e armazenados a -20 °C.

3.29 Titulação dos anticorpos

A presença de anticorpos policlonais específicos nos soros de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes foi avaliada por ELISA . Uma concentração de 250 ng/poço de proteína recombinante diluída em tampão carbonato foi adsorvida em placa de microdiluição por 16 h a 4 °C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com a solução de bloqueio PBS-T/Leite por 2h a 37 °C. Em outra placa, foi feita uma diluição seriada dos soros de camundongos em PBS-T/Leite contendo 10 % de extrato de *E. coli* para adsorção dos anticorpos inespecíficos, ou seja, anticorpos gerados contra contaminantes de *E. coli* que podem estar contidos nas alíquotas de proteína recombinante purificada. Após a incubação de 1 h, 50 µL das amostras adsorvidas foram transferidas para a outra placa e incubado a temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e uma solução com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (*Sigma-Aldrich*) na diluição 1:3000 foi adicionada. A reação enzimática foi revelada conforme descrito anteriormente. A intensidade da reação foi analisada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492nm. O título de anticorpos foi considerado a maior diluição dos soros com valor da DO_{492nm} maior ou igual a 0,1. Da mesma forma que realizado para soro de camundongos, a presença de anticorpos no soro de hamsters imunizados com as proteínas recombinantes também foram avaliados. Nesse caso, anti-IgG de hamster conjugado a peroxidase (*Sigma-Aldrich*) e anti-IgG1 ou anti-IgG2/3 de hamster

conjugado a peroxidase (*Southern Biotechnology*) foram utilizados na diluição 1:3000. O mesmo critério de título foi utilizado.

3.30 Linfoproliferação celular

Após o procedimento de imunização, os camundongos BALB/c foram sacrificados em CO₂ e seus baços foram assepticamente removidos e colocados em meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) contendo 2 mM L-glutamina, 100 IU/mL de Penicilina, 100 µg/mL de Streptomicina e 50 µg/mL de Gentamicina. Os baços foram macerados e centrifugados por 10 minutos a 1100 rpm, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de água gelada estéril no sedimento celular para lise dos eritrócitos; após este procedimento, as suspensões foram novamente centrifugadas. O sobrenadante resultante foi descartado e os esplenócitos foram ressuspensos em 1 mL de RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino. As células foram avaliadas quanto sua viabilidade por meio da coloração de *Trypan blue* 0,4% (Invitrogen), e posteriormente distribuídas em triplicata em uma placa de cultura celular de 96 poços (Costar, Corning, Tewksbury, MA, EUA), na quantidade de 5×10^5 células/poço. Os esplenócitos foram tratados com 5 µg/mL de Concanavalina A (ConA – *Sigma-Aldrich*), empregado como controle positivo de proliferação, 5 µg/mL de cada proteína recombinante ou não foram estimulados (apenas meio), sendo este tratamento empregado como controle negativo de proliferação. Foi feita a cultura destas células por 48 h em atmosfera de 5 % CO₂, e a 37 °C. A taxa de proliferação celular foi determinada em função da replicação do DNA medida pela incorporação de bromodesoxiuridina (BrdU), um análogo de base nitrogenada timina. A detecção de BrdU incorporado foi feita utilizando o kit colorimétrico *Cell Proliferation ELISA, BrdU* (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN). As células foram incubadas por 2 h com BrdU para permitir a marcação do DNA genômico. Em seguida, anticorpo anti-BrdU conjugado com peroxidase (1:100) foi adicionado e as células foram incubadas por 90 min. A solução de substrato para a enzima foi adicionada e incubada à temperatura ambiente por 15 min. A reação enzimática foi parada pela adição de 1M de H₂SO₄ e a densidade óptica foi medida a 450 nm. O Índice de Estimulação (I.E) foi calculado como sendo o quociente entre a média da absorbância das células estimuladas com a proteína recombinante e a média da absorbância das células cultivadas apenas em meio, ou seja, sem estímulo, dentro do grupo dos animais imunizados. Para análise estatística realizada pelo teste *t-Student*, primeiro foi avaliada a diferença entre um grupo imunizado e o grupo PBS

estimulado *in vitro* com a proteína recombinante e, em seguida, entre o grupo de animais tratados que foram estimulados *in vitro* com aquele que recebeu apenas meio. Um p-valor menor que cinco por cento foi considerado estatisticamente significativo.

3.31 Dosagem de citocinas

Para análise das citocinas secretadas, as células do baço foram cultivadas e estimuladas em placas de cultura de 24 poços, cada qual contendo 5×10^6 células, em triplicata. Após 48 h de cultura, a placa foi centrifugada e o sobrenadante resultante da cultura celular foi coletado e armazenado em curto prazo a -20°C . As citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α foram avaliadas por ELISA (PreproTech, Colonia Narvarte, México), de acordo com as instruções do fabricante. Em suma, o anticorpo de captura foi imobilizado em placa de ELISA por 16 h. No dia seguinte a placa foi lavada e bloqueada com solução de bloqueio por 1 h. Os padrões de citocinas foram diluídos para compor uma curva de concentração. Então, 100 μL de cada sobrenadante foram adicionados a cada poço, e a placa foi incubada por 2 h a 37°C . Anticorpo de detecção na diluição de 1:2000 foi adicionado e incubado por 2 h, em seguida, o substrato foi adicionado a cada poço e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. As leituras colorimétricas foram feitas no comprimento de onda de 405 nm, e os valores de absorbância foram convertidos em valores de concentração mediante comparação com a curva de concentrações gerada. A análise estatística foi realizada da mesma forma descrita para o ensaio de linfoproliferação celular.

3.32 Ensaio de imunoproteção

Os ensaios de imunoproteção foram realizados em colaboração com o laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da USP. Hamsters machos (80 a 120 g) e recém-desmamados foram imunizados por via subcutânea com 50 μg de proteína recombinante purificada associada a algum dos adjuvantes listados a seguir: 12 % de hidróxido de alumínio (*Alhydrogel* 2%), 10 μg de MPLA de *B. pertussis* ou 250 μg de DDA (*dimethyldioctadecylammoniumbromide*). Foram realizadas duas imunizações por via subcutânea, em intervalos de 15 dias. Após duas semanas de cada imunização os animais foram sangrados e o soro obtido foi avaliado por ELISA como descrito acima. Os animais foram imunizados também com uma preparação de leptospiros inativadas a 56°C por 20

minutos (*bacterina*) que foi usado como controle positivo, além de serem imunizados com PBS 1x associado ao hidróxido de alumínio ou MPLA, utilizado como controle negativo. Após a segunda imunização, os animais foram desafiados, por via intraperitoneal, com 1×10^4 *L. interrogans* virulenta sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm e acompanhados durante 21 dias para análise de sobrevivência. Os animais sobreviventes foram então sacrificados e seus rins foram coletados, macerados em solução salina e inoculados em meio EMJH para avaliação da presença de leptospiros após 6 semanas de observação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Capítulo I

Seleção *in silico* de candidatos vacinais e identificação *in vitro* da presença dos genes e seus respectivos transcritos

Acredita-se que o desenvolvimento de uma vacina é uma das melhores estratégias para prevenção da leptospirose. Por esse motivo, a busca por antígenos com potencial vacinal é um processo fundamental. Porém, dificuldades relacionadas ao cultivo de leptospirosas sempre foram um dos fatores limitantes para identificação de novos alvos vacinais. Apenas com a chegada da era genômica, grandes avanços puderam ser obtidos. O sequenciamento completo do genoma de *Leptospira* spp. associado ao desenvolvimento de ferramentas de bioinformática contribuíram não apenas para o desenvolvimento de vacinas, mas também para identificação de proteínas envolvidas nos processos de virulência do patógeno. Com a possibilidade de explorar sequências genômicas, novos genes que potencialmente codificam fatores de virulência, proteínas secretadas ou associadas à membrana estão sendo identificados. Em particular, genes que codificam para proteínas de membrana externa merecem destaque, porque devido à localização podem participar nos processos de adesão e invasão do hospedeiro e, assim, facilitar a colonização da bactéria. Além disso, podem servir como alvo para o sistema imunológico e, potencialmente, ser capaz de mediar uma resposta imune no hospedeiro. Assim, para seleção dos genes a partir do genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, utilizamos alguns critérios de predição avaliados por bioinformática que consistem em: ser de membrana externa, ter peptídeo sinal de exportação à membrana, possuir ou não domínio conservado em fatores de virulência de outros patógenos, ser hipotética e, além disso, conservada nas cepas patogênicas.

Neste capítulo apresentamos os resultados obtidos referente às análises realizadas *in silico* para seleção dos genes do presente estudo. O primeiro passo da seleção foi feito com base na localização celular. Em seguida, analisamos a presença de domínios proteicos nas sequências já selecionadas. E por fim, comparamos a similaridade das sequências selecionadas com sequências de outras espécies e sorovares de *Leptospira*. Nessa etapa, utilizamos sequências de aminoácidos, que são geradas por tradução conceitual das sequências de nucleotídeos depositadas no NCBI. Após as análises *in silico*, realizamos um experimento *in vitro* para demonstrar a conservação desses genes entre algumas espécies e sorovares de *Leptospira*.

4.1.1 Seleção por bioinformática de genes de *Leptospira* como possíveis alvos vacinais

4.1.1.1 Análise *in silico* da localização celular e presença de domínios proteicos

No presente trabalho os genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 presentes no cromossomo I de *L. interrogans* sorovar Copenhageni foram selecionados. Segundo análise realizada pelo *software* LipoP (JUNCKER et al., 2003), observamos que a sequência de aminoácidos dos três genes apresentam o sinal SpI. Esse sinal é reconhecido por uma enzima chamada de peptidase sinal I, no qual é responsável pela clivagem do peptídeo sinal. Esse fato sugere fortemente que as proteínas expressas serão encaminhadas à membrana da célula. O endereçamento de proteínas em procariotos é um evento bastante comum, onde marcações específicas presentes nas sequências codificadoras (CDSs – coding sequences) são utilizadas com intuito de direcionar as proteínas sintetizadas no citoplasma ou para a membrana celular, ou espaço periplasmático, ou membrana externa ou ainda, para o meio extracelular. Em espiroquetas, todas as proteínas de membrana externa identificadas apresentam uma sequência sinal de exportação (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004).

Em seguida, os resultados obtidos pelo *software* LipoP foram reforçados pelos dados gerados pelos programas PSORT e CELLO, que são programas utilizados para predizer em qual compartimento celular a proteína se localiza (YU et al., 2006; YU et al., 2010). De acordo com as análises, todas as sequências do presente estudo apresentam alta probabilidade de estarem alocadas na membrana externa de *Leptospira*. Essa estratégia baseada na análise das sequências genômicas apresenta uma série de vantagens em relação à estratégia convencional, que envolve a cultura em ampla escala do microrganismo e isolamento da proteína, na busca de candidatos vacinais. Vários microrganismos, como *Neisseria meningitidis* (PIZZA et al., 2000), *Streptococcus pneumoniae* (WIZEMANN et al., 2001), *Staphylococcus aureus* (ETZ et al., 2002), *Mycobacterium tuberculosis* (BETTS, 2002), *Escherichia coli* uropatogênica (ALTERI et al., 2009) e até a *Leptospira interrogans* (GAMBERINI et al., 2005) já tiveram proteínas interessantes identificadas utilizando essa abordagem.

Após analisar a probabilidade das proteínas selecionadas serem moléculas de membrana externa, outro passo relevante para o nosso trabalho foi analisar os domínios proteicos que as sequências selecionadas apresentam. Essas análises são interessantes porque diversas proteínas presentes na superfície celular carregam em suas estruturas sequências

conservadas que são responsáveis por desempenhar uma função específica. Para analisar tal propriedade, os programas PFAM (SONNHAMMER; EDDY; DURBIN, 1997) e SMART (LETUNIC et al., 2006; SCHULTZ et al., 1998) foram utilizados. Os resultados gerados mostram a identificação de dois domínios interessantes. O primeiro domínio chamado PD40 definido como “*WD-like Beta Propeller Repeat*” corresponde a uma família de domínios proteicos identificados em proteínas de superfície celular com função desconhecida (ADINDLA et al., 2004). Em eucariotos, proteínas contendo o domínio WD-40, apresentam uma variedade de funções, relacionadas tanto com a transdução de sinal, bem como com a regulação transcricional (STIRNIMANN et al., 2010). O segundo domínio identificado foi o domínio OmpA, que é similar ao domínio C-terminal da proteína de membrana externa OmpA, por isso chamado de *OmpA_C-like* ou *OmpA-like*. Tem sido observado que esse domínio se associa de forma não covalente ao peptidoglicano da bactéria. O membro mais bem estudado desta família de proteínas corresponde a proteína OmpA de *E.coli*, à qual foi atribuída diferentes funções. Como por exemplo, já foi demonstrado que esta proteína OmpA pode contribuir para a patogenicidade da bactéria devido a sua capacidade de se ligar a proteína reguladora do complemento C4BP. Além disso, foi demonstrado a interação da proteína OmpA com uma glicoproteína presente nas células endoteliais capaz de promover o rearranjo de actina da célula e, em seguida, a internalização da bactéria. Baseado nesse contexto, pesquisas vêm sendo realizadas com uma série de proteínas de bactérias Gram-negativas que apresentam homologia com o domínio OmpA (CROCQUET-VALDES et al., 2001; OLDFIELD et al., 2008; PRASADARAO et al., 2002; PRASADARAO et al., 2003; YAN et al., 2010). Assim, o fato das proteínas selecionadas apresentarem esses dois domínios interessantes, reforça a possibilidade das sequências, quando codificadas, estarem presentes na superfície da célula, e, em consequência disso, desempenharem diversas funções. Na Figura 3, apresentamos um esquema das sequências LIC13479, LIC10050 e LIC10537, evidenciando os domínios conservados e as regiões de estruturas secundárias preditas pelo programa CAPITO (WIEDEMANN; BELLSTEDT; GORLACH, 2013).

Figura 3 – Esquema representativo das proteínas apresentando os respectivos domínios. Os domínios PD40 (*WD-like Beta Propeller Repeat*) e *OmpA-like* (*outer membrane protein A*) identificados nas CDSs LIC13479, LIC10050 e LIC10537 pelos programas SMART e PFAM, e as regiões de estruturas secundárias, α -hélice, folha- β e estruturas irregulares preditas pelos programas CAPITO e Phyre² são demonstrados.

4.1.1.2 Conservação *in silico* dos genes entre diferentes cepas de *Leptospira*

Baseado na problemática que as vacinas existentes são sorovar dependentes, um passo importante para o nosso trabalho foi verificar se as sequências selecionadas são conservadas entre diferentes espécies patogênicas de *Leptospira*. Para isso a ferramenta BLAST foi utilizada, e por análise comparativa com as sequências de aminoácidos preditas podemos observar que as CDSs LIC13479, LIC10050 e LIC10537 apresentam 99 % de identidade com a sequência disponível da *L.interrogans* sorovar Lai e da *L. interrogans* sorovar Kenewicki cepa Pomona Fromm (REN et al., 2003). Em relação à espécie patogênica *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis, alta porcentagem de identidade também foi observada (BULACH et al., 2006). No entanto, um percentual de similaridade também foi encontrado na espécie não patogênica *L. biflexa*. De qualquer maneira, como mostra a Figura 4, há uma distância maior entre os ramos dos filogramas apresentados, o que denota uma menor identidade quando comparado com outras sequências de leptospiros, que embora seus genomas não estejam completamente sequenciados, algumas sequências encontram-se depositadas no banco de dados. Por fim, o fato das sequências apresentarem alto grau de conservação *in silico* as torna

alvos interessantes de estudo, uma vez que a busca por antígenos conservados é fundamental para o desenvolvimento de uma vacina. Um resumo de todas as análises de bioinformática realizadas pode ser observado na tabela 2.

Figura 4 –Análise da conservação *in silico* entre *Leptospira* spp. Filogramas foram gerados a partir de sequências de aminoácidos disponíveis no banco de dados GenBank para analisar a conservação das sequências codificadas pelos genes LIC13479 (A), LIC10050 (B) e LIC10537 (C).

Tabela 2 – Resumo das análises realizadas por bioinformática

Gene ID ¹	Descrição do gene	Peptídeo Sinal ² (SpI)	Domínio ³	Conservação (identidade %) ⁴	Referência
LIC13479 (Lsa46) *	Proteína hipotética	1-34	OmpA PD40	<i>L.interrogans</i> sv Lai (99) <i>L. santarosaisv</i> Shermani (77) <i>L. borgpeterseniisv</i> Hardjo-bovis (77) <i>L.licerasiae</i> svVarillal (58) <i>L.biflexa</i> sv Patoc (45)	Ren et al., 2003. Chou et al., 2012 Bulach et al.,2006 Ricaldi et al., 2012 Picardeau et al., 2008
LIC10050 (Lsa77) *	Proteína hipotética	1-21	OmpA PD40	<i>L.interrogans</i> sv Lai (99) <i>L. santarosaisv</i> Shermani (89) <i>L. borgpetersenii</i> sv Hardjo-bovis (89) <i>L.licerasiae</i> sv Varillal (58) <i>L.biflexa</i> sv Patoc (44)	Ren et al., 2003. Chou et al., 2012 Bulach et al.,2006 Ricaldi et al., 2012 Picardeau et al., 2008
LIC10537	Proteína periplasmática associada ao peptideoglicano	1-20	OmpA PD40	<i>L.interrogans</i> sv Lai (99) <i>L. santarosaisv</i> Shermani (89) <i>L. borgpetersenii</i> sv Hardjo-bovis (84) <i>L.licerasiae</i> sv Varillal (58) <i>L.biflexa</i> sv Patoc (52)	Ren et al., 2003. Chou et al., 2012 Bulach et al.,2006 Ricaldi et al., 2012 Picardeau et al., 2008

¹<http://aeg.ibi.ic.unicamp.br/world/lic/>; LIC: *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

²<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP>

³<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>

⁴<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>

sv = sorovar

*Nomeadas a partir deste trabalho

4.1.2 Análise *in vitro* da presença dos genes e expressão em *Leptospira* spp.

4.1.2.1 Análise da presença dos genes selecionados entre diferentes espécies de *Leptospira*

A primeira etapa experimental do nosso trabalho foi uma tentativa de corroborar os dados obtidos *in silico* com os dados *in vitro*. Como as análises de conservação revelaram alta porcentagem de identidade com algumas espécies e sorovares de leptospiros, nós selecionamos algumas linhagens, provenientes de uma biblioteca de cepas de leptospiros, que são mantidas em cultura na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. As linhagens patogênicas selecionadas para realização dos testes foram: *L. interrogans* sorovar Copenhageni, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Kennewicki cepa Pomona Fromm, hardjo, *L. borgpetersenii* sorovar Whitticombi, *L. kirshnery* sorovar Cynoptera, *L. kirshnery* sorovar

Grippothyfosa, *L. santarosai* sorovar Shermani, *L. noguchii* sorovar Panama. Já a espécie saprófita selecionada foi a *L. biflexa* sorovar Patoc. O DNA genômico de todas as cepas selecionadas foram extraídos e quantificados (Figura 5), 100 ng de DNA foi utilizado em uma PCR convencional juntamente com os oligonucleotídeos específicos, para verificar a presença dos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 nas diferentes linhagens. A tabela 1 mostra as sequências de cada oligonucleotídeo sintético empregado para amplificação.

Figura 5 – Extração de DNA genômico de *Leptospira* spp.. Perfil eletroforético de DNA genômico das espécies patogênicas *L. interrogans* sorovar Canicola (1), *L. borgpetersenii* sorovar Whitticombi (2), *L. Kirschneri* sorovares Cynopteri (3) Grippothyphosa (4), *L. interrogans* sorovares Copenhageni (5) Icterohaemorrhagiae (6), *L. noguchi* sorovar Panama (7), *L. interrogans* sorovares Pomona (8) Hardjo (9), *L. santarosai* sorovar Shermani (10) e da espécie saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc (11). M: Marcador Lambda *HindIII*.

Os resultados obtidos revelam que os genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 foram detectados nos diferentes sorovares da espécie patogênica *L. interrogans* (Figura 6). Esse resultado corrobora com as análises realizadas *in silico*, visto que, em torno de 98 % a 99 % de identidade foi encontrado entre essas sequências codificadoras. Embora uma similaridade relativamente alta tenha sido observada entre as sequências codificadoras de outras espécies patogênicas, o DNA genômico dessas espécies não foi amplificado (Figura 6). Para explicar tal resultado, nós realizamos um alinhamento entre as sequências de nucleotídeos dessas linhagens. Notamos que, apesar das sequências LIC13479, LIC10050 e LIC10537 apresentarem porcentagens de identidade superior a 80 % para algumas espécies (tabela 3), diferenças encontradas na região de anelamento dos *primers* impediram a amplificação dos genes. Quando as sequências de nucleotídeos dos sorovares de *L. interrogans* foram analisadas, alta porcentagem de identidade foi observada, principalmente na região de anelamento dos oligonucleotídeos, que certamente foi primordial para a amplificação. Fato curioso foi notado com o gene LIC13479, porque ao realizar o alinhamento com a sequência presente no genoma da *L. santarosai* sorovar Shermani nenhuma similaridade é encontrada. No entanto, ao realizar um alinhamento apenas com a sequência do oligonucleotídeos, foram

identificadas pequenas regiões de anelamento, o que provavelmente acarretou em uma amplificação inespecífica. Em relação à espécie não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc, nenhum gene foi observado, embora as sequências codificadoras do presente estudo apresentem em torno de 40 % de identidade, quando alinhamos as sequências de nucleotídeos não há similaridade, o que justifica tal resultado (Figura 6). O conjunto desses resultados mostra que apesar da ausência de amplificação dos genes em outras espécies de leptospiros, as sequências codificadoras do presente estudo apresentam alta porcentagem de identidade e, por isso, podem apresentar epitopos importantes para obtenção de uma resposta imune.

Figura 6 –Análise da presença dos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 em *Leptospira* spp. DNA genômico das espécies patogênicas *L. interrogans* sorovares: Copenhageni (1), Canicola (2), Icterohaemorrhagiae (3) Pomona (4), Hardjo (5), *L. borgpetersenii* sorovar Whitticombi (6), *L. kirshneri* sorovares Cynopteri (7) e Grippotyphosa (8), *L. santarosai* sorovar Shermani (9), *L. noguchii* sorovar Panama (10) e da espécie saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc (11) foram extraídos e submetidos à técnica de PCR. Os fragmentos gerados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com GelRed™. (A) LIC13479, (B) LIC10050 e (C) LIC10537. A integridade das amostras de DNA genômico foi verificada por amplificação do fragmento de DNA 16S ribossomal (D).

Tabela 3 – Alinhamento dos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 em *Leptospira* spp.

Linhagens	LIC13479	LIC10050	LIC10537
	% de identidade entre as sequências de nucleotídeos		
<i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni	100% *	100% *	100% *
<i>L. interrogans</i> sorovar Canicola	99%	99%	99%
<i>L. interrogans</i> sorovar Icterohaemorrhagiae	100%	100%	100%
<i>L. interrogans</i> sorovar Pomona	99%	99%	99%
<i>L. borgpetersenii</i> sorovar Whitticombi	NS	NS	NS
<i>L. kirshneri</i> sorovar Grippotyphosa	90%	92%	94%
<i>L. santarosai</i> sorovar Shermani	NS	83%	84%
<i>L. noguchii</i> sorovar Panama	88%	93%	92%
<i>L. biflexa</i> sorovar Patoc	NS	NS	NS

*sequência utilizada como referência

NS – nenhuma similaridade encontrada

4.1.2.2 Análise da presença dos transcritos nos genes selecionados entre diferentes espécies de *Leptospira*

Após analisar a presença dos genes nas diferentes espécies e sorovares de leptospiros, o próximo passo foi verificar se os genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 são expressos. Para isso, o RNA total das linhagens selecionadas foi isolado e submetido à reação da transcriptase reversa para geração de cDNA. Após a amplificação por PCR, os resultados revelaram ausência de transcritos entre as diferentes espécies patogênicas de *Leptospira*. Esse resultado já era esperado, visto que ao analisar a presença dos genes entre essas espécies patogênicas, nenhum gene foi amplificado por conta da divergência encontrada na região de anelamento com os oligonucleotídeos utilizados. No entanto, o mesmo resultado foi observado para todos os sorovares de *L. interrogans* (Figura 7). Como sabemos que os *primers* utilizados são capazes de amplificar os genes dos sorovares de *L. interrogans*, possivelmente essa ausência de amplificação observada está relacionada com alguma questão técnica ou com capacidade de alteração transcricional, já que é sabido que leptospiros mantida em cultura por longo tempo perdem a virulência (HAAKE et al., 1991; MATSUNAGA et al., 2003). Além da virulência, outros fatores como temperatura e osmolaridade, também podem estar envolvidos com a regulação da expressão, como observado com outros genes de leptospiros (LO et al., 2006; MATSUNAGA et al., 2007). A Figura 7 D mostra a amplificação do RNA ribossômico 16S, no qual foi usado como controle da integridade das amostras.

Figura 7 - Análise da presença dos transcritos dos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537. cDNA das espécies patogênicas *L. interrogans* sorovares: Copenhageni (1), Canicola (2), Icterohaemorrhagiae (3) Pomona (4), Hardjo (5), *L. borgpetersenii* sorovar Whitticombi (6), *L. kirshneri* sorovares Cynopteri (7) e Grippotyphosa (8), *L. santarosai* sorovar Shermani (9), *L. noguchii* sorovar Panama (10), e da espécie saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc (11), foram submetidos à técnica de PCR para análise de amplificação. Os fragmentos gerados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com Gel RedTM. (A) LIC13479, (B) LIC10050 e (C) LIC10537. A integridade das amostras foi verificada por amplificação do fragmento de DNA 16S ribossomal (D). No controle negativo (C-) não foi adicionado DNA na reação. Em relação ao controle (C), a reação foi realizada com DNA genômico da *L. interrogans* sorovar Copenhageni. RT+ refere-se às amostras tratadas com a enzima transcriptase reversa e RT- às não tratadas.

4.1.2.3 Análise da expressão dos genes selecionados por PCR em tempo real

O fato dos transcritos não terem sido identificados por RT-PCR, nos levou a duvidar se esses genes realmente estão sendo expressos nas leptospiros. Assim, com o intuito de confirmar a presença dos transcritos, realizamos uma PCR em tempo real (qPCR), devido a capacidade desta técnica em quantificar os ácidos nucleicos de maneira mais precisa e com maior reprodutibilidade (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Para realização desse experimento, RNAs foram extraídos a partir de culturas de leptospiros das seguintes linhagens: *L.interrogans* sorovar Copenhageni cepas M20 (atenuada) e L1-130 (virulenta), além da cepa saprofítica *L. biflexa*. Após a extração, os RNAs foram transcritos em cDNA por RT-PCR para serem utilizados nas reações. Algumas padronizações foram realizadas para definir a melhor concentração de oligonucleotídeos (tabela 1) e cDNA a serem utilizados. Como controle endógeno, o gene ribossomal 16S foi utilizado por ser altamente conservado entre as bactérias. Além disso, foi demonstrado que a expressão desse gene foi mais estável do que os genes *lipL41* e *flaB*, quando culturas de leptospiros foram submetidas a diferentes temperaturas (CARRILLO-CASAS et al., 2008). Em experimentos realizados com células eucarióticas, o uso de subunidades de RNA ribossômicos também tem sido relatado como os genes mais confiáveis a serem utilizados (BUSTIN et al., 2005). Assim, após as padronizações realizadas, a expressão dos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 foi normalizada em relação ao gene 16S. Em seguida, a expressão dos genes na *L. interrogans* virulenta e *L. biflexa* foi comparada em relação à expressão na *L.interrogans* (M20). A comparação foi feita em relação a essa cepa, pelo fato de ter sido a cepa escolhida para realizar grande parte do nosso trabalho, incluindo a clonagem dos genes.

Os resultados obtidos mostram que os genes foram expressos em todas as cepas testadas (Figura 8). Interessante notar que os genes LIC13479 e LIC10050 tiveram uma maior expressão na linhagem virulenta em relação à cepa atenuada, o que indica que estes genes podem participar ativamente durante a infecção. Já o gene LIC10537, embora uma maior expressão tenha sido notada, o resultado não foi tão expressivo quanto ao observado para os outros genes. Os três transcritos foram também detectados na *L. biflexa*, porém é importante ressaltar que *primers* específicos foram desenhados para amplificar as sequências nessa cepa, visto que regiões de similaridade entre as sequências de nucleotídeos das leptospiros patogênica e saprofítica não foram encontrados. Essa recomendação para modificação de *primers*, se necessário, surgiu a partir de um trabalho realizado por Bourhy e colaboradores

(2011), onde notaram que um polimorfismo na região das sequências alvos entre as cepas patogênicas analisadas afetou o resultado da qPCR. Além disso, nenhuma amplificação foi detectada com o DNA obtido das espécies saprofíticas e intermediárias de leptosiras.

Figura 8 – Expressão dos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 em *Leptospira* spp. Oligonucleotídeos específicos para cada gene, 100 ng de cDNA e o corante SYBR Green I, foram utilizados nas reações de RT-qPCR. Como controle, todos os reagentes foram utilizados, exceto cDNA (NTC). O *fold change* foi calculado pelo método $\Delta\Delta C_T$ a partir dos valores de ΔC_T obtidos após normalização com o controle endógeno 16S. O gráfico mostra a média dos níveis de expressão relativa de cada gene na espécie patogênica e saprofítica em relação à espécie atenuada *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M20) $\pm$ o desvio padrão de três experimentos independentes.

4.2 Capítulo II

Obtenção das formas recombinantes dos candidatos vacinais selecionados

A oportunidade de pesquisar novos alvos vacinais a partir da tecnologia do DNA recombinante vem causando grande impacto para a pesquisa de desenvolvimento de vacinas, e conseqüentemente, para o entendimento do patógeno. A possibilidade de clonar genes de interesse em vetores que permite tanto a amplificação do gene como a expressão em outro hospedeiro tem facilitado o campo da microbiologia, principalmente, em relação aos patógenos que apresentam antígenos que são expressos em baixa quantidade ou mascarados por outro antígeno imunodominante. Na grande maioria dos casos, os antígenos imunodominantes não são considerados bons alvos para o desenvolvimento de uma vacina, devido à resposta imune inadequada que é gerada. No entanto, são esses antígenos que são sempre selecionados pela metodologia convencional, ou seja, que requer o cultivo *in vitro* do patógeno, na busca por alvos vacinais. Outro fator que impede a seleção pelo método convencional está relacionado ao fato que existem antígenos que são expressos apenas *in vivo* durante a infecção. Por esse motivo, o uso de novas estratégias para poder avaliar e caracterizar antígenos vacinais são fundamentais.

Neste capítulo apresentamos o processo de clonagem dos genes selecionados, as condições realizadas para expressão desses genes, em diferentes cepas de *E. coli*. Após a confirmação da expressão, apresentamos os resultados de purificação das proteínas recombinantes e análise de suas estruturas por dicroísmo circular. Por fim, apresentamos o reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos monoclonais, contra os resíduos de histidina, e anticorpos policlonais, produzido em camundongos, contra cada proteína específica. Uma vez obtida às proteínas recombinantes, além de avaliar o seu potencial vacinal, podemos caracterizá-las, e assim, associar a alguma função específica. Desse modo, essa abordagem, além de permitir um melhor entendimento da patogênese da *Leptospira*, permite também melhorar o potencial da resposta imune, a qualidade e segurança da vacina, visto que estamos trabalhando com proteínas purificadas. Além disso, o custo e benefício dessa abordagem são inquestionáveis quando comparado a outras abordagens utilizadas.

4.2.1 Clonagem, expressão e purificação dos candidatos vacinais

4.2.1.1 Clonagem dos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537

Para clonar os genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 oligonucleotídeos específicos (tabela 1) foram utilizados para amplificar por PCR os fragmentos de DNA a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. A Figura 9 mostra o perfil eletroforético em gel de agarose 1 % dos produtos de PCR amplificados. Os fragmentos amplificados apresentaram o tamanho esperado de 1176 pb para LIC13479, 2004 pb para LIC10050 e 1914 pb para LIC10537, e assim puderam ser purificados do gel.

Figura 9 – Amplificação dos genes LIC13479, LIC10050 e LIC10537 por PCR. DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni foi extraído e utilizado como molde na reação. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1 % e apresentaram os seguintes tamanhos (A) 1176 pb para LIC13479, (B) 2004 pb para LIC10050 e (C) 1914 pb para LIC10537. M, Marcador molecular (*Kb Plus DNA Ladder*).

Uma vez purificados, os produtos de PCR foram utilizados para subclonagem em vetor pGEM-T Easy. Este vetor permite a seleção de colônias possivelmente positivas por meio da seleção conhecida como azul/branco em placas contendo IPTG e X-Gal. Assim, após a ligação dos insertos neste vetor, o mesmo foi introduzido, por quimiotransformação, em *E. coli* DH5 α e os clones supostamente positivos foram utilizados para extração de DNA. A Figura 10 mostra a seleção de clones positivos após a realização de um teste de digestão com as enzimas de restrição *Xho*I e *Hind*III. Nota-se que dos quatro clones selecionados para LIC13479, apenas o clone 1 apresentou um fragmento de tamanho esperado (1176 pb). Já em relação à LIC10050 os três clones selecionados de fato foram positivos. No entanto, nenhum fragmento de tamanho esperado para o gene LIC10537 foi observado, sugerindo que falhas no processo de clonagem tenham ocorrido. Por esse motivo, novas tentativas de ligação do

inserto LIC10537 com o pGEM-T Easy foram realizados até conseguirmos clones positivos (dados não mostrados).

Figura 10 – Análise de restrição enzimática de clones selecionados a partir do vetor de clonagem pGEM-T Easy. DNA plasmidial foi extraído e submetido a um teste de digestão com as enzimas *XhoI* e *HindIII*. Os fragmentos liberados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com Gel Red™. (A) LIC13479, (B) LIC10050 e (C) LIC10537. Coluna: 1, 2, 3 e 4 se referem aos clones selecionados para o teste de digestão. M, Marcador molecular (*Kb Plus DNA Ladder*).

Um fragmento positivo, respectivo a cada gene, foi então purificado do gel de agarose, e em seguida, clonado no vetor de expressão pAE. Como este vetor não possui um diferencial de seleção para as colônias positivas, ou seja, com a presença do inserto, selecionamos algumas colônias de forma aleatória. Assim, após o processo de transformação, realizamos uma extração bruta de DNA com fenol-clorofórmio (Figura 11). Os clones que apresentaram um aumento de massa em relação ao vetor selvagem foram considerados positivos. Cinco clones foram selecionados para LIC13479, 3 clones para LIC10050 e 2 clones para LIC10537.

Figura 11 – Análise da extração de DNA plasmidial por fenol-clorofórmio. O plasmídeo pAE contendo o respectivo inserto, (A) LIC13479, (B) LIC10050 e (C) LIC10537, foi introduzido em uma linhagem competente de *E. coli*. O DNA plasmidial dos clones foram extraídos de forma rápida por fenol-clorofórmio e visualizados em gel de agarose 1 % corado com Gel RedTM. Amostras: M, Marcador molecular (*Kb Plus DNA Ladder*); coluna 1 dos géis se referem ao vetor pAE vazio, e 2, 3, 4, 5 e 6 se referem aos clones selecionados.

Dois clones de cada construção foram selecionados e submetidos ao ensaio de restrição enzimática para verificar se houve a ligação do inserto. Como demonstrado na Figura 12, os clones selecionados referente à LIC13479, LIC10050 e LIC10537, e digeridos com as enzimas apropriadas (*XhoI* e *HindIII*) apresentaram um fragmento de DNA de tamanho esperado. Para certificar que os fragmentos liberados de fato correspondiam a esses genes, um clone referente a cada gene foi selecionado e submetido a uma reação de sequenciamento.

Figura 12 – Análise de restrição enzimática de clones selecionados a partir do vetor pAE. O plasmídeo pAE contendo o respectivo inserto foi introduzido em uma linhagem competente de *E. coli*. O DNA plasmidial foi extraído e submetido a um teste de digestão com as enzimas *XhoI* e *HindIII*. Os fragmentos liberados foram visualizados em gel de agarose 1 % corado com Gel RedTM. (A) LIC13479, (B) LIC10050 e (C) LIC10537. Amostra: 1 e 2 se referem aos clones selecionados para o teste de digestão. M, Marcador molecular (*Kb Plus DNA Ladder*).

Dados obtidos após o sequenciamento mostram que os genes LIC13479 e LIC10050 foram clonados em fase correta de leitura. A LIC10050 não apresentou nenhum tipo de mutação. No entanto, o gene referente à LIC13479 apresentou dois pontos de mutação, sendo uma silenciosa e a outra houve troca de uma serina por uma asparagina. Por se tratar de aminoácidos polares resolvemos continuar os estudos com essa construção. De qualquer forma, ambas as construções apresentaram o códon de início ATG, seguido dos códons que codificam para as seis histidinas, os códons que correspondem ao sítio de restrição, originalmente existentes no sítio de clonagem múltipla do vetor pAE, e o início do gene (Figura 13 A e B). Nós não obtivemos sucesso com a clonagem do gene LIC10537, visto que não identificamos os códons de início e nem os códons relacionados à sequência de histidina (Figura 13 C). Diante das diversas tentativas e dificuldades encontradas nesse processo de clonagem nós modificamos a estratégia utilizada para obtenção desse gene.

Figura 13 – Eletroferograma das sequências de DNA. As construções geradas, pAE+LIC13479 (A), pAE+LIC10050 (B) e pAE+LIC10537 (C) foram submetidas ao sequenciamento pelo método de terminação de cadeia. As sequências sublinhadas mostram: o códon de iniciação ATG, os códon que codificam seis histidinas, a sequência da enzima de restrição *XhoI* e o início do gene.

Assim, com o intuito de também caracterizar as propriedades funcionais e avaliar o potencial vacinal do gene LIC10537, nós resolvemos fragmentar esse gene, na tentativa de facilitar o processo da clonagem. Na Figura 14, é apresentado um esquema da sequência de aminoácidos que corresponde ao gene inteiro da LIC10537, fragmento 1 que corresponde a

porção N-terminal da proteína e fragmento 2 correspondente a porção C-terminal da LIC10537.

Esquema representativo referente a sequência de aminoácidos da LIC10537

Figura 14 – Esquema representativo dos fragmentos referente ao gene LIC10537. O primeiro fragmento se refere à clonagem da porção N-terminal (24-371 aa), no qual foi clonada sem a sequência do peptídeo sinal (1-23aa). O segundo fragmento se refere à porção C-terminal, que contém o domínio *OmpA-like*.

Para clonagem dos respectivos fragmentos, oligonucleotídeos específicos foram desenhados (tabela 1) e utilizados para amplificação por PCR. Como molde, o DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni foi utilizado. A Figura 15 mostra o perfil eletroforético em gel de agarose 1 % dos produtos de PCR amplificados com os respectivos tamanho esperado de 1025 pb para o fragmento 1 e 889 pb para o fragmento 2.

Figura 15 – Análise dos fragmentos amplificados referente ao gene LIC10537 por PCR. DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni foi extraído e utilizado como molde na reação de PCR. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1 % e apresentaram os seguintes tamanhos (A) 1025 pb para o fragmento 1 da LIC10537, (B) 889 pb para o fragmento 2 da LIC10537. M, Marcador molecular (*Kb Plus DNA Ladder*).

Uma vez purificado, os produtos de PCR foram utilizados para subclonagem em vetor pGEM-T Easy. Assim, após a ligação do inserto neste vetor, o mesmo foi utilizado para transformar *E. coli* DH5 α . Os clones supostamente positivos foram utilizados para extração de DNA e teste de digestão com as enzimas específicas. Conforme é apresentado na Figura 16, todos os clones selecionados liberaram um fragmento de tamanho esperado.

Figura 16 – Análise de restrição enzimática de clones selecionados a partir do vetor de clonagem pGEM-T Easy. DNA plasmidial foi extraído e submetido a um teste de digestão com as enzimas *XhoI* e *HindIII*. Os fragmentos liberados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com Gel RedTM. (A) fragmento 1 da LIC10537 e (B) fragmento 2 da LIC10537. Coluna: 1, 2, 3 e 4 se referem aos clones selecionados para o teste de digestão. M, Marcador molecular (*Kb Plus DNA Ladder*).

Em seguida, os fragmentos positivos foram purificados do gel de agarose, e posteriormente, clonados no vetor de expressão pAE. Após o processo de transformação, 4 colônias, representativo de cada fragmento, foram selecionadas de forma aleatória e submetidas ao ensaio de restrição enzimática para verificar se de fato houve ligação do inserto. Como demonstrado na Figura 17, todos os clones selecionados, tanto do primeiro como do segundo fragmento do gene LIC10537, quando digeridos com as enzimas *XhoI* e *HindIII*, liberaram um fragmento de DNA correspondente ao gene LIC10537. Para certificar que os fragmentos liberados de fato correspondiam aos fragmentos gênicos esperados, um clone relacionado a cada gene foi selecionado e submetido a uma reação de sequenciamento.

Figura 17 – Análise de restrição enzimática de clones selecionados a partir do vetor pAE. O plasmídeo pAE contendo o respectivo inserto foi introduzido em uma linhagem competente de *E. coli*. O DNA plasmidial foi extraído e submetido a um teste de digestão com as enzimas *XhoI* e *HindIII*. Os fragmentos liberados foram visualizados em gel de agarose 1 % corado com Gel Red™. (A) fragmento 1 da LIC10537 e (B) fragmento 2 da LIC10537. Coluna: 1, 2, 3, 4 e 5 se referem aos clones selecionados para o teste de digestão. M, Marcador molecular (*Kb Plus DNA Ladder*).

Os eletroferogramas gerados após o sequenciamento das construções mostram que os dois fragmentos foram clonados em fase de leitura. Ambas as construções apresentaram o códon de início ATG, seguido dos códon que codificam para as seis histidinas, os códon que correspondem ao sítio de restrição, originalmente existentes no sítio de clonagem múltipla do vetor pAE, e o início de cada gene (Figura 18). Finalmente, podemos concluir que a clonagem dos três genes foi obtida com sucesso, e demos continuidade ao nosso trabalho.

Figura 18 –Eletroferograma das seqüências de DNA. As construções geradas, pAE + fragmento 1 da LIC10537 (A) e pAE + fragmento 2 da LIC10537 (B), foram submetidas ao sequenciamento pelo método de terminação de cadeia. As seqüências sublinhadas mostram: o códon de iniciação ATG, os códons que codificam seis histidinas, a seqüência da enzima de restrição *XhoI* e o início do gene.

4.2.1.2 Padronização das condições de expressão em linhagens de *E. coli* geneticamente modificadas

E. coli é um dos hospedeiros mais amplamente usado para a produção de proteínas heterólogas (BANEYX, 1999). Uma série de linhagens tem sido modificada para permitir uma melhor expressão de tais genes. No presente estudo, com o intuito de verificar a expressão do gene de interesse, o vetor pAE contendo o gene LIC13479 foi introduzido em 4 linhagens de *E. coli*. As linhagens transformadas foram BL21(DE3), BL21 Star (DE3) pLysS, C43 (DE3) e BL21 SI, cada uma apresentando características específicas, como descrito no Material e Métodos. Com exceção da cepa BL21 SI, que foi cultivada a 30 °C, as outras linhagens foram cultivadas a 37 °C sob agitação, até atingir uma densidade óptica de 0,6. A partir desse momento, a expressão do gene heterólogo foi induzida por diferentes concentrações de indutor (1, 0,1 e 0,01 mM de IPTG ou 5, 50 e 500 mM de NaCl)

adicionados ao meio de cultura. Após essa adição, o crescimento bacteriano foi acompanhado de uma em uma hora, por um período máximo de 3 horas. Em seguida, as culturas foram centrifugadas e a massa bacteriana obtida foi lisada e separada em duas frações, uma solúvel e outra insolúvel, que corresponde respectivamente ao sobrenadante e *pellet*. Os resultados obtidos após análise em SDS-PAGE 12 % mostram que todas as linhagens testadas foram capazes de expressar o gene LIC13479, no entanto, uma super expressão foi observada apenas nas linhagens BL21(DE3) e BL21 Star (DE3) pLysS. Em ambas as cepas, notamos que a proteína LIC13479 foi expressa na fase insolúvel, em forma de corpúsculos de inclusão (Figura 19).

Figura 19 – Análise de expressão da proteína recombinante LIC13479 em linhagens de *E. coli* geneticamente modificadas. SDS-PAGE 12 % do extrato total de linhagens de *E. coli* transformadas com o vetor pAE/LIC13479. A expressão do gene LIC13479 foi induzida pela adição de diferentes concentrações de IPTG ou NaCl. Os extratos bacterianos foram coletados antes e após cada hora de indução. Após centrifugação, a massa bacteriana obtida foi lisada e separada em fração solúvel e insolúvel. Amostras: M. Padrão de Massa Molecular. 1. Extrato total antes da indução; 2. Extrato total de 1h após indução; 3. Extrato total de 2h após indução; 4. Extrato total de 3h após indução; 5. Fração solúvel; 6. Fração insolúvel.

De fato, proteínas recombinantes quando expressas de forma insolúvel apresentam algumas vantagens relacionadas com o alto rendimento obtido (SINGH; PANDA, 2005). No entanto, devido à formação desses agregados insolúveis, a proteína se encontra em um estado inativo, o que dificulta avaliar suas propriedades funcionais. Nesse sentido, tentativas para obter proteínas de forma solúvel são válidas, portanto, novos testes de indução foram realizados, dessa vez, apenas a linhagem BL21 (DE3) foi utilizada. Essa linhagem foi então cultivada na presença de diferentes concentrações de IPTG por 3 h a 30 °C, e por 16 h a 18 °C (dados não mostrados). Análises dos extratos bacterianos induzidos revelam que nenhuma diferença foi observada quanto ao nível de expressão, além disso, a proteína foi expressa na forma de corpúsculos de inclusão, quando induzida a 30 °C. Quando a cultura foi submetida à temperatura de 18 °C, o gene não foi expresso (SCHEIN, 1991). Assim, os estudos prosseguiram com a condição de crescimento a 37 °C.

Em relação à expressão do gene LIC10050, o vetor pAE contendo o respectivo gene foi utilizado para transformar as mesmas linhagens de *E. coli* utilizada anteriormente. As condições de crescimento e as concentrações de indutor também foram iguais ao que foi descrito para LIC13479. Como observado na Figura 20, após análise por SDS-PAGE 12 %, os resultados mostram que o gene LIC10050 foi expresso, de forma insolúvel, apenas nas linhagens BL21(DE3) e BL21 Star (DE3) pLysS. No entanto, a linhagem BL21 Star (DE3) pLysS apresentou um nível de expressão maior do que a BL21 (DE3). O fato das linhagens BL21 Star carregar um gene truncado para a enzima RNase E mantém os níveis de RNA mensageiro estável, e por isso, pode aumentar o rendimento da proteína recombinante (LOPEZ et al., 1999). A expressão da lisozima T7 nessa linhagem é importante para que a proteína recombinante seja expressa apenas na presença do indutor, o que seria de extrema importância no caso de proteínas tóxicas para a bactéria (STUDIER, 1991).

Figura 20 – Análise de expressão da proteína recombinante LIC10050 em linhagens de *E. coli* geneticamente modificadas. SDS-PAGE 12 % do extrato total de linhagens de *E. coli* transformadas com o vetor pAE/LIC10050. A expressão do gene LIC10050 foi induzida pela adição de diferentes concentrações de IPTG ou NaCl. Os extratos bacterianos foram coletados antes e após cada hora de indução. Após centrifugação, a massa bacteriana obtida foi lisada e separada em fração solúvel e insolúvel. Amostras: M. Padrão de Massa Molecular. 1. Extrato total antes da indução; 2. Extrato total de 1h após indução; 3. Extrato total de 2h após indução; 4. Extrato total de 3h após indução; 5. Fração solúvel; 6. Fração insolúvel.

Para verificar a expressão dos fragmentos gerados a partir do gene LIC10537, as linhagens BL21(DE3), BL21 Star (DE3) pLysS, C43 (DE3) e BL21 SI foram transformadas. Dessa vez, a expressão dos genes heterólogos foi induzida com a maior concentração de indutor utilizada anteriormente (1 mM de IPTG ou 500 mM de NaCl). As mesmas condições de cultivo e processamento das amostras, utilizadas para LIC13479 e LIC10050, foram empregados nessa etapa. Os resultados obtidos após análise em SDS-PAGE 12 % mostram que para o fragmento 1, todas as linhagens testadas, exceto C43 (DE3), foram capazes de expressar esse fragmento, que corresponde a porção N-terminal da proteína. No caso do fragmento 2, apenas a linhagem BL21(DE3) foi incapaz de expressar essa proteína.

Notoriamente, uma super expressão foi observado na linhagem BL21 Star (DE3) pLysS na forma insolúvel (Figura 21).

Figura 21 – Expressão dos fragmentos recombinantes gerados a partir do gene LIC10537. SDS-PAGE 12% do extrato total de linhagens de *E. coli* transformadas com o vetor pAE/fragmento 1 da LIC10537 e pAE/fragmento 2 da LIC10537. A expressão do gene foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG ou 500 mM de NaCl. Os extratos bacterianos foram coletados antes e após cada hora de indução. Após centrifugação, a massa bacteriana obtida foi lisada e separada em fração solúvel e insolúvel. Amostras: M. Padrão de Massa Molecular. 1. Extrato total antes da indução; 2. Extrato total de 1h após indução; 3. Extrato total de 2h após indução; 4. Extrato total de 3h após indução; 5. Fração solúvel; 6. Fração insolúvel.

4.2.1.3 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade ao metal

Para os ensaios de purificação da proteína recombinante, nós escolhemos a linhagem BL21 Star (DE3) pLysS, porque foi a linhagem que melhor expressou a maioria das proteínas. A condição de cultivo estabelecida foi de 37 °C sob agitação por 3 horas, após a adição de 1 mM de indutor. Ao final da indução, a cultura foi centrifugada e a massa de células obtidas foi

lisada. Como as proteínas foram expressas na forma de corpúsculos, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi solubilizado em tampão de desnaturação contendo 8 M de ureia. O extrato proteico solubilizado foi passado por uma coluna de cromatografia de afinidade ao níquel, a um fluxo de aproximado de 1 mL por minuto. Como o vetor de expressão utilizado adiciona uma sequência de seis histidinas na extremidade N-terminal da proteína, esses resíduos se ligam fortemente ao níquel. Antes da eluição, as proteínas recombinantes LIC13479 e LIC10050 passaram por um processo de renaturação (*refolding*) na coluna, onde concentrações decrescentes de ureia foram utilizadas até a remoção completa desse agente. Após renaturação, tampões contendo baixas concentrações de imidazol foram utilizados para remover os contaminantes que estão associados fracamente. Por fim, as proteínas recombinantes foram eluídas com 1M de imidazol.

Como mostra a Figura 22, as frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE 12 %. Nota-se que proteína rLIC13479 purificada apresentou algumas impurezas nas primeiras frações obtidas (Figura 22 A). A repurificação das alíquotas mais contaminadas, não resultou em uma melhor purificação (dado não mostrado). O mesmo foi observado em relação à purificação da rLIC10050 (Figura 22 C). As frações correspondentes a rLIC13479 e rLIC10050 foram divididas em frações mais e menos concentradas, e submetidas ao processo de diálise em tampão adequado. As frações mais concentradas precipitaram durante esse processo. Em relação à purificação dos fragmentos recombinantes, gerados a partir da LIC10537, outra estratégia de renaturação foi utilizada. A renaturação foi realizada após a eluição da proteína. Assim, durante o processo de diálise foi feito um gradiente de remoção de ureia de forma bastante lenta. A Figura 22 E e G mostra as frações eluídas analisadas por SDS-PAGE 12%. Apesar do processo realizado para remoção de ureia ter sido feito de forma bem gradual, houve precipitação de proteína. Após a diálise, todas as proteínas recombinantes foram quantificadas pelo *software GelQuant*. Para isso, concentrações estabelecidas da proteína BSA foram utilizadas para estimar a massa das bandas referente à rLIC13479 (Figura 22 B), rLIC10050 (Figura 22 D), fragmento 1 (Figura 22 F) e fragmento 2 (Figura 22 H) da LIC10537, por densitometria. Assim, as concentrações estimadas para as proteínas foram: 0,1 µg/µL para rLIC13479 (46 kDa), 0,7 µg/µL para rLIC10050 (76 kDa), 0,15 µg/µL para o fragmento 1 (40 kDa) e 0,3 µg/µL para o fragmento 2 (33 kDa) da LIC10537. Embora tenha ocorrido precipitação de algumas alíquotas podemos afirmar que as proteínas recombinantes foram obtidas com êxito.

Figura 22 – Análise por SDS-PAGE das amostras obtidas após processo de purificação e estimativa da concentração das proteínas recombinantes. A e C corresponde as frações da proteína rLIC13479 e rLIC10050 eluídas com 1M de imidazol. E e G corresponde as frações dos fragmentos recombinantes eluídas com 20 mM de imidazol. As colunas 2, 3, 4 ou 5 de B, D, F e H corresponde as concentrações de BSA (4, 2, 1 ou 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A coluna 1 de B (rLIC13479), D (rLIC10050), F (fragmento 1) e H (fragmento 2) corresponde a 10 μL de proteína aplicada no gel. M. Padrão de Massa Molecular.

4.2.1.4 Reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos

Uma vez obtida as proteínas purificadas, camundongos BALB/c foram imunizados três vezes por via subcutânea, com 10 µg de cada proteína recombinante associada ao adjuvante hidróxido de alumínio (*Alhydrogel* 2 %). Duas semanas após cada imunização, os animais foram sangrados e os soros obtidos foram utilizados para o reconhecimento das proteínas por *Western blotting*. Os resultados mostram que os anticorpos policlonais gerados foram capazes de reconhecer as proteínas recombinantes LIC13479 (Figura 23 A), LIC10050 (Figura 23 C), fragmento 1 (Figura 23 E) e fragmento 2 (Figura 23 G) da LIC10537, como demonstrado pela presença de bandas majoritárias no tamanho esperado. Nota-se que apenas para a proteína rLIC13479 (Figura 23A) bandas únicas foram detectadas. Enquanto, para as outras proteínas recombinantes bandas adicionais foram detectadas, o que sugere o reconhecimento não específico de outras proteínas de *E. coli*.

Com o intuito de verificar o reconhecimento específico das proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais anti-His foram utilizados. Os resultados visualizados para rLIC13479 (Figura 23 B), para rLIC10050 (Figura 23 D), para o fragmento1 (Figura 23 F), e para o fragmento 2 (Figura 23 H) da LIC10537 mostram o reconhecimento pelo anticorpo utilizado. Para a proteína rLIC10050 e fragmento 1 da LIC10537 bandas adicionais foram detectadas no extrato total pós indução e na fração insolúvel obtida, possivelmente essas bandas surgiram como resultado de degradação devido a super expressão dessas proteínas, visto que após a purificação essas bandas desaparecem (Figura 23 D e F – linha 5).

Figura 23 – Reatividade de anticorpos específicos contra as proteínas recombinantes por Western blotting.

As proteínas foram aplicadas em gel de SDS 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose, no qual foi incubada com anti-soro policlonal específico nas seguintes diluições 1:800 para rLIC13479 (A), 1:1600 para rLIC10050 (C), 1:600 para o fragmento 1 (E) e para o fragmento 2 (G) da LIC10537. Todas as incubações realizadas com o anticorpo monoclonal foi utilizado na diluição 1:5000. B, D, F e H correspondem respectivamente à ordem já descrita acima para as proteínas. As colunas correspondem: 1. Extrato total antes da indução; 2. Extrato total após indução; 3. Fração solúvel; 4. Fração insolúvel e 5. Proteína purificada. A reação foi revelada por quimioluminescência utilizando o kit ECL.

4.2.1.5 Avaliação da estrutura secundária por dicroísmo circular

Como os genes selecionados foram expressos como proteínas na forma insolúvel, e em consequência disso, passaram pelo processo de renaturação, um passo importante para o nosso trabalho foi verificar se as proteínas purificadas retomaram suas estruturas. Um método importante utilizado para analisar estruturas secundárias de biomoléculas é por dicroísmo circular (SREERAMA; WOODY, 1994). Assim, as proteínas recombinantes purificadas foram novamente dialisadas em um tampão apropriado. Os resultados obtidos a partir dos espectros gerados sugerem que a proteína rLIC13479 apresenta um predomínio de folhas β , característico pela presença de um pico negativo em aproximadamente 218 nm e um pico positivo em 195 nm (GREENFIELD, 2006). Apesar de não ter sido visualizado a formação de um pico positivo completo, há indícios de formação desse pico positivo (Figura 24 A). Para a proteína rLIC10050 apenas um pico negativo na faixa de 208 nm foi visualizado. Na literatura é demonstrado que proteínas com predomínio de α -hélice apresentam dois picos negativos, um em aproximadamente 208 nm e outro em 222 nm, um pico positivo em 193 nm (GREENFIELD, 2006). Portanto, o pico visualizado no espectro gerado para rLIC10050 pode indicar a presença de estruturas do tipo α -hélice (Figura 24 B). No caso dos fragmentos gerados a partir da LIC10537 o espectro referente ao primeiro fragmento mostra um pico negativo em aproximadamente 218 nm e um pico positivo em aproximadamente 195 nm, sugerindo a presença de estruturas do tipo folhas β (Figura 24 C). Já para o segundo fragmento, um pico negativo na faixa de 208 nm é notado, e o espectro gerado mostra indícios de formação de um pico em torno de 190 nm (Figura 24 D).

Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise *in silico* pelo programa CAPITO(WIEDEMANN; BELLSTEDT; GORLACH, 2013) que confirma a predominância de estruturas do tipo folha β para rLIC13479 (36 %), fragmento 1 da LIC10537 (37 %) e fragmento 2 da LIC10537 (32 %). Predominância de estruturas do tipo α -hélice foi detectado para rLIC10050 (21 %). Apesar da alta porcentagem obtida de estruturas irregulares, podemos evidenciar a presença de estruturas secundárias em todas as proteínas recombinantes analisadas. A tabela 4 mostra as análises dos espectros pelo programa CAPITO.

Figura 24 – Análise de estrutura secundária por dicroísmo circular. As medições de espectroscopia circular foram feitas a 20 °C em um espectropolarímetro equipado com uma unidade Peltier para controle de temperatura. O espectro foi medido usando uma célula de 1 mm a intervalos de 0,5 nm e apresentado como uma média de 5 leituras. (A) espectro gerado para a proteína rLIC13479, (B) para a proteína rLIC10050 (C) para o fragmento 1 e (D) para o fragmento 2 da LIC10537.

Tabela 4 – Análise dos espectros pelo programa CAPITO

Proteína	folha β (%)	α -hélice (%)	estrutura irregular (%)
rLIC13479	36	10	51
rLIC10050	0,1	21	70
fragmento 1	37	0	58
LIC10537			
fragmento 2	32	0,03	61

4.3 Capítulo III

Expressão e localização celular dos candidatos vacinais selecionados

Experimentos que confirmem a expressão e a localização das proteínas na superfície das leptospiiras são importantes, visto que essa localização é ideal para as interações patógeno-hospedeiro. Além disso, proteínas de superfície, por participarem dessas interações, podem atuar como excelentes antígenos vacinais, caso uma resposta imune direcionada seja obtida. Como no capítulo 1, as análises realizadas *in silico* indicaram que os genes selecionados quando codificados apresentam grandes possibilidades de localização na superfície da bactéria. Em adição, os dados obtidos por PCR em tempo real mostraram a presença dos transcritos nas leptospiiras. Assim, experimentos que confirmem a expressão desses genes a nível proteico e a localização dessas proteínas nativas na célula são necessários. Neste capítulo, apresentamos a detecção das proteínas nativa em extrato total de leptospiiras e o reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos presentes no soro de indivíduos infectados. Além disso, dados obtidos por meio das técnicas de triton x-114, imunofluorescência e ELISA, nos dão uma ideia sobre a localização dessas proteínas na célula.

4.3.1 Avaliação da expressão das proteínas selecionadas para o presente estudo

4.3.1.1 Detecção das proteínas nativas no extrato proteico de *Leptospira* spp.

Com o objetivo de confirmar se os genes selecionados quando codificados são de fato expressos, extrato proteico total de leptospiros foi obtido e utilizado para detecção destas proteínas por *Western blotting*. Inicialmente, utilizamos extratos de diferentes cepas de leptospiros como uma tentativa de demonstrar, além da expressão, a presença dessas proteínas em outras espécies, visto que, a identificação de proteínas conservadas entre diferentes cepas é um critério importante não somente para o desenvolvimento de vacinas para leptospirose, mas também para outras infecções bacterianas, sobretudo aquelas causadas por diferentes sorovares (FELDMAN; ANDERSON, 2014; HAAKE et al., 1999).

Os extratos proteicos foram então separados em SDS-PAGE 12 % e transferidos para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com antissoro anti-rLIC13479, anti-rLIC10050 e com os antissoros obtidos referente a cada fragmento recombinante gerado a partir da LIC10537. Em seguida, anticorpos anti-IgG conjugado com peroxidase foram utilizados. Na Figura 25 A, é visualizado o gel de poliacrilamida contendo o extrato proteico referente a cada espécie e sorovar de leptospira. Nessa etapa do trabalho as proteínas nativas não foram detectadas (dados não mostrados). Possivelmente, o fator limitante foi o baixo número de cópias destas proteínas nas bactérias, uma vez que um trabalho de proteômica quantitativa, realizado com a cepa virulenta *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130, demonstrou a identificação dessas proteínas com número de cópias abaixo do limite de detecção (MALMSTROM et al., 2009).

Figura 25 – Análise por SDS-PAGE de extratos protéicos de *Leptospira* spp.. Extratos totais de leptospiros foram separadas por SDS-PAGE 12 % (A) . As linhas se referem às espécies patogênicas *L. interrogans* sorovar Canicola (1), *L. borgpetersenii* sorovar Whitcombi (2), *L. Kirschneri* sorovares Cynopteri (3) Grippothyphosa (4), *L. interrogans* sorovares Copenhageni (M20) (5) Icterohaemorrhagiae (6), *L. noguchi* sorovar Panama (7), *L. interrogans* sorovares Pomona (8) Hardjo (9), *L. santarosai* sorovar Shermani (10), *L. interrogans* sorovares Copenhageni (L1-130) (12) e da espécie saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc (11).

Nova tentativa para detectar as proteínas do presente trabalho nos extratos proteicos de leptospiros foi realizada. Dessa vez, um volume expressivo de cultura foi utilizado para a obtenção desses extratos proteicos, e também géis de espessura e poços maiores, que permitem aplicação de uma quantidade maior de amostra por coluna. Nesse experimento, por limitação de espaço e reagentes, a detecção das proteínas foi realizada apenas para as seguintes cepas: *L. interrogans* sorovar Copenhageni M20 (cepa atenuada), *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm, *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 (cepas virulentas) e a cepa não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc. A Figura 26 mostra que todas as proteínas nativas foram detectadas em pelo menos um extrato referente às cepas patogênicas e não detectadas no extrato da cepa saprofítica. A proteína LIC13479 foi detectada também no extrato da cepa atenuada, porém a intensidade da banda foi menor quando comparado com a cepa virulenta (Figura 26 A). O antissoro da proteína LIC13479 não reagiu de forma cruzada com nenhuma outra proteína presente no extrato. Já o antissoro da proteína LIC10050 reagiu de forma inespecífica com uma proteína presente em todas as cepas testadas (Figura 26 B). Em relação à LIC10537, os anticorpos gerados contra os dois fragmentos foram capazes de reconhecer a proteína nativa (Figura 26 C e D), embora uma banda mais expressiva seja notada na cepa atenuada quando comparado com a cepa virulenta. De maneira geral, o fato de detectarmos essas proteínas no extrato total de

leptospira mostra que elas realmente são expressas pela bactéria, e estão de acordo com o que foi descrito pelo trabalho de proteômica (MALMSTROM et al., 2009).

Figura 26 – Detecção das proteínas nativas em extratos de *Leptospira* spp.. Extratos totais de leptospiros e as proteínas recombinantes purificadas (controle positivo) foram separados por SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram incubadas com antissoro (A) anti-rLIC13479, (B) anti-rLIC10050, (C) anti-fragmento 1 e (D) anti-fragmento 2 da LIC10537. Em seguida, anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase foi utilizado. A reatividade foi detectada por quimioluminescência utilizando o kit ECL (GE Healthcare). As linhas de A e B se referem: (1) proteína recombinante (2) *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M20), (3) *L. interrogans* sorovar Kennewicki (LPF) e (4) *L. biflexa* sorovar Patoc, já as linhas de C e D correspondem (1) aos fragmentos recombinantes gerados a partir da LIC10537, (2) *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M20), (3) *L. interrogans* sorovar Copenhageni (L1-130), (4) *L. interrogans* sorovar Kennewicki (LPF) e (5) *L. biflexa* sorovar Patoc.

4.3.1.2 Expressão das proteínas durante a infecção

Uma vez confirmado que as proteínas selecionadas são expressas pela bactéria, o próximo passo foi verificar se isto ocorre durante a infecção. Para isso, soros de indivíduos infectados com leptospirose foram utilizados com o intuito de verificar se os anticorpos gerados nesses indivíduos são capazes de reconhecer as proteínas recombinantes. Assim, a

reatividade das respectivas proteínas foi avaliada com amostras de soros de ambas as fases da doença, que corresponde a fase inicial (MAT-) e fase convalescente (MAT+). Um total de 38, 36 e 24 amostras pareadas foram utilizadas para rLIC13479, rLIC10050 e fragmentos gerados a partir da LIC10537, respectivamente. As amostras foram consideradas reativas quando apresentaram valores maiores do que o estabelecido pelo *cutoff*, que foi baseado a partir da reatividade com um *pool* de soro comercial, pertencente a indivíduos saudáveis. Conforme observado na Figura 27, anticorpos reativos foram detectados em ambas as fases da doença para proteína rLIC13479 e rLIC10050. Sessenta e três por cento dos soros correspondente a fase inicial foram reativos para rLIC13479. Enquanto que, 84 % dos soros de fase convalescente apresentaram anticorpos capazes de reconhecer essa proteína (Figura 27 A). Em relação à proteína rLIC10050, uma porcentagem menor de soros reativos foi observado na fase MAT+ quando comparado com a rLIC13479. De qualquer modo, 55 % dos soros testados foram capazes de reagir com essa proteína recombinante (Figura 27 B). O fragmento 1 gerado a partir da LIC10537 não apresentou reatividade com nenhum soro testado. Já o fragmento 2, embora a porcentagem de reatividade não tenha sido alta, ambas as fases da doença apresentaram soros reativos (Figura 27 C). Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que as proteínas selecionadas participam em algum momento da infecção e apresentam epítomos que são importantes para o reconhecimento imune.

Outro ponto interessante que pôde ser observado com esse experimento, e merece destaque, foi a reatividade elevada que as proteínas rLIC13479 e rLIC10050 apresentaram com os soros de fase inicial da doença, onde a leptospirose ainda não é detectada pelo teste de diagnóstico padrão que é utilizado. Portanto, esses dados sugerem o potencial dessas proteínas como marcador de diagnóstico, uma vez que a busca por antígenos que possam ser reconhecidos na fase inicial da doença é um campo de intensa pesquisa para a leptospirose (CRODA et al., 2007; NEVES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008). Assim, com o objetivo de verificar se o reconhecimento dos anticorpos pelas proteínas rLIC13479 e rLIC10050 é específico, amostras de soros de indivíduos infectados com outras doenças como dengue, malária, doença de Chagas e HIV foram utilizadas. Como observado na Figura 27 A e B, apenas a proteína rLIC13479 apresentou reatividade com 2 amostras de soro de dengue e 1 de malária, apresentando então 83 % e 91 % de especificidade, respectivamente. Apesar de não ser o foco principal do trabalho, o fato dos dados obtidos revelarem que as proteínas rLIC13479 e rLIC10050 apresentam grande potencial para o uso em testes de diagnóstico merece ser destacado. Essa propriedade deve ser melhor explorada com uma amostragem

maior de soros de pacientes infectados pela doença. Entretanto, devido ao potencial observado como marcador no início da doença, uma solicitação de propriedade intelectual para uso em diagnóstico está em andamento no Instituto Butantan.

Figura 27 – Reatividade das proteínas recombinantes com amostras de soro. Reatividade positiva foi determinada por ELISA com as proteínas rLIC13479 (A), rLIC10050 (B) e fragmentos gerados a partir da LIC10537 (C). MAT+ refere-se à reatividade de soros de pacientes com leptospirose na fase convalescente e MAT- refere-se aos soros da fase inicial da doença. Amostras de soros dos indivíduos com HIV, dengue, Malária e Chagas foram utilizados para verificar a especificidade da reação com outras doenças não relacionadas à leptospirose. A reatividade foi avaliada por meio de anticorpos IgG totais, detectados por meio de incubação com anticorpos anti-IgG humano conjugados com peroxidase na diluição de 1:3000. Os valores de corte (*cutoff*), representados pela barra horizontal, são definidos como a média mais três desvios-padrão dos valores de absorbância de indivíduos saudáveis.

4.3.2 Avaliação da localização celular das proteínas selecionadas

4.3.2.1 Análise da localização celular da LIC13479, LIC10050 e LIC10537 após fracionamento com Triton X-114

A localização celular das proteínas nativas foi avaliada após o fracionamento celular de *L. interrogans* com Triton X-114. Esse detergente, inicialmente, permite a solubilização da membrana externa das bactérias sem promover alteração na membrana citoplasmática e, com isso, duas frações são obtidas (ZUERNER et al., 1991). Uma dessas frações, a solúvel ao detergente, pode ainda ser separada em duas fases após a elevação de temperatura, o que resulta em uma fase hidrofóbica rica em detergente (fase DET) e uma fase aquosa com pouco detergente (fase AQ). Tem sido observado que lipoproteínas de membrana externa e proteínas transmembranas são encontradas na fase DET, enquanto que proteínas periplasmáticas são fracionadas na fase AQ. Todo o material insolúvel ao detergente, denominado defração do cilindro protoplasmático (CP), é composto por proteínas de membrana interna e componentes citoplasmáticos (HAAKE et al., 1993; HAAKE et al., 2000; HAAKE et al., 1998; SHANG; SUMMERS; HAAKE, 1996). Desde então, essa metodologia tem sido bastante utilizada para o estudo de proteínas de membrana de leptospiros (CULLEN et al., 2003; EVANGELISTA et al., 2014; GOMEZ et al., 2008; MATSUNAGA et al., 2006; PINNE; HAAKE, 2009).

Assim, as diferentes frações obtidas foram analisadas por *Western blotting* com anticorpos policlonais específicos para cada proteína. Como controle, foi utilizado antissoro de proteínas com localização celular conhecida. A importância em utilizar esses controles, se baseia no fato de garantir que a solubilização e o método do fracionamento tenham sido executados corretamente. As nossas análises revelaram que a proteína OmpL1 foi solubilizada parcialmente pela extração do Triton X-114 e encontrada na fração DET, como esperado (HAAKE et al., 1993). Já a proteína DnaK que deveria estar presente na fração do CP, foi solubilizada também de forma parcial e encontrada na fração AQ (Figura 28 A). Esse padrão da DnaK após a solubilização com o detergente Triton X-114 é similar ao padrão encontrado por Guerreiro e colaboradores (2001), quando analisaram essas frações com um *pool* de soro de indivíduos com leptospirose, sugerindo que a localização celular primária é no citoplasma, mas que podem estar distribuídos em outros compartimentos celulares. A grande maioria dos estudos utiliza como controle de proteínas internas (fração CP), a proteína do flagelo FlaA1. Porém, como não temos anticorpos contra essa proteína esse controle não pôde ser realizado.

Em relação às proteínas do presente estudo, LIC13479 apresentou um padrão similar a OmpL1, sugerindo a exposição na superfície da célula (Figura 28 B). Já a LIC10050 e LIC10537 um padrão diferente foi observado, visto que LIC10050 não foi solubilizada pelo detergente e, por isso, foi detectada apenas na fração do CP (Figura 28 B). A proteína LIC10537, embora tenha sido solubilizada de forma parcial, quando foi fracionada, foi encontrada exclusivamente na fração AQ (Figura 28 C). Resultados como este tem sido observado por Pinne e Haake (2009), que mostraram que OmpL36 e OmpL37 foram, em grande parte, insolúvel ao detergente, e apenas uma pequena parte de OmpL37 foi solubilizada e fracionada na fração AQ. No entanto, outros métodos foram utilizados e indicaram fortemente a presença dessas proteínas na superfície, sugerindo a existência de falhas nessa metodologia.

Figura 28 – Padrão das proteínas após o fracionamento com Triton X-114 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. *L. interrogans* foi solubilizada com o detergente Triton X-114 e as frações obtidas após o fracionamento foram separadas em SDS-PAGE 12 % e transferidas para membranas de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram incubadas com antissoro (A) anti-rOmpL1 e anti-DnaK, (B) anti-rLIC13479 e anti-rLIC10050, (C) anti-fragmento 1 e anti-fragmento 2 da LIC10537. Em seguida, anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase foi utilizado. A reatividade foi detectada por quimioluminescência utilizando o kit ECL. As frações analisadas foram: Fase detergente (DET), Fase aquosa (AQ) Material insolúvel ao detergente (CP) e proteína recombinante (PR).

4.3.2.2 Análise da localização celular das proteínas nativas por imunofluorescência

Outro método utilizado para avaliar a localização da LIC13479, LIC10050 e LIC10537 nas leptospiros foi por imunofluorescência. Nesse ensaio, as leptospiros inicialmente foram fixadas com paraformaldeído e, em seguida, foram incubadas com o antissoro respectivo a cada proteína. Após a incubação com esses anticorpos, as amostras foram tratadas com o anti-IgG de camundongo conjugado a FITC para permitir a visualização

das proteínas marcadas no microscópio. Além disso, iodeto de propídio foi utilizado para marcação do DNA genômico das leptospiros com o objetivo de mostrar a integridade das bactérias. Como controle positivo foi utilizado o antissoro da proteína LipL21, pelo fato de ser uma proteína sabidamente expressa na superfície (CULLEN et al., 2003). Como esperado foi observado uma fluorescência, como resultado da presença do fluoróforo FITC, e indiretamente o reconhecimento dessa proteína. Já como controle negativo, a proteína citoplasmática DnaK foi utilizada (GUERREIRO et al., 2001). Neste caso, apenas a fluorescência no vermelho foi detectada, devido à cor do iodeto de propídeo (Figura 29). Em relação às proteínas do presente estudo, os resultados apresentados revelam que o antissoro gerado contra as proteínas rLIC13479, rLIC10050, fragmento 1 e fragmento 2 da LIC10537 foram capazes de reconhecer as proteínas nativas presentes na *L. interrogans* sorovar Copenhageni, tanto na cepa atenuada M20 (Figura 29 A), como na linhagem virulenta L1-130 (Figura 29 B). Embora o sinal de fluorescência emitido em verde tenha sido fraco e, em alguns casos, pontos únicos tenha sido visualizado, quando observamos as sobreposições das imagens notamos a co-localização das marcações, o que sugere fortemente que as proteínas codificadas por esses genes estão localizadas na superfície da bactéria. Esse mesmo padrão de imagens em pontos isolados foi verificado para outra proteína que apresenta o domínio OmpA-like (OLIVEIRA et al., 2011). Talvez, o baixo número de cópias dessas proteínas na bactéria possa explicar essa distribuição focal e a baixa intensidade de fluorescência. Fato curioso foi observado quando esse mesmo experimento foi realizado com a cepa saprofítica, visto que a marcação das células com o antissoro respectivo de cada proteína foi também capaz de reconhecer proteínas nativas presentes nesta cepa (Figura 29 C). A fluorescência observada na cepa saprofítica *L. biflexa* deve-se provavelmente ao fato das sequências presentes nessa bactéria terem 45 % de identidade em relação a cepa virulenta, e por isso, alguns epitopos, possivelmente, puderam ser reconhecidos por esses anticorpos. Além disso, os dados sugerem a participação de epitopos conformacionais, visto que ao analisar a expressão dessas proteínas em extrato proteico de *L. biflexa* por *western blotting*, nenhuma detecção é notada. Interessante notar que a Loa22, outra proteína que também contém o domínio *OmpA-like* (KOIZUMI; WATANABE, 2003), apresenta 56 % de identidade com a cepa saprofítica, e ainda assim, dados na literatura mostram que essa proteína é essencial para virulência das leptospiros (RISTOW et al., 2007).

Figura 29 – Localização celular das proteínas nativas por imunofluorescência. *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 (A), *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (B) e *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1 foram fixadas com paraformaldeído e incubadas com antissoro contra LipL21, DnaK, rLIC13479, rLIC10050 e fragmentos 1 e 2 gerados a partir da LIC10537. Em seguida, anti-IgG de camundongo conjugado com FITC foi empregado para permitir a visualização das proteínas nativas em fluorescência verde. As bactérias foram incubadas com iodeto de propídio (IP) para marcação do DNA genômico. As imagens foram captadas em microscópio de imunofluorescência confocal LSM 510 META (FITC, excitação 488 nm, emissão 500-550 nm e Iodeto de propídeo, excitação 543 nm, emissão 612-619 nm), e podem ser visualizadas isoladamente (IP e FITC) ou sobrepostas.

L. interrogans L1-130

L. biflexa Patoc 1

4.3.2.3 Análise da localização celular por ELISA

Outra forma de avaliar a presença das proteínas na superfície das leptospiiras é por ELISA empregando a bactéria intacta. Assim, utilizamos *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1-130 e *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1, imobilizadas em placa de ELISA. Em seguida, os antissoros produzidos contra as proteínas rLIC13479 e rLIC10050 foram incubados e a presença das proteínas nativas foi verificada. O antissoro da proteína citoplasmática DnaK foi usado como controle negativo. Uma vez que essa proteína não deve ser detectada, por se tratar de bactérias intactas, valores mínimos de absorbância devem ser encontrados. Os resultados obtidos mostram que a detecção de ambas as proteínas LIC13479 e LIC10050 apresentaram valores de absorbância superior aos valores encontrados para DnaK, o que sugere a presença dessas proteínas na superfície da célula (Figura 30). Da mesma forma como observado no ensaio de imunofluorescência, os antissoros gerados contra as proteínas recombinantes LIC13479 e LIC10050 foram capazes de reconhecer proteínas presentes na cepa saprofítica, o que corrobora com a hipótese desses anticorpos reconhecerem apenas os epítomos conformacionais, e muito provavelmente, esses epítomos estão localizados na região de similaridade entre as sequências.

Figura 30 – Detecção das proteínas nas leptospiiras intacta. Em placa de ELISA, 10^9 /mL de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepas M20 e L1-130, e *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1 foram imobilizadas. A detecção da ligação foi feita após a incubação com antissoro contra a proteína recombinante (1:50 para rLIC13479 e rLIC10050 e 1:1000 para rDnaK), seguida da incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:3000). Os dados representam o valor da média das absorbâncias em 492 nm $\pm$ desvio padrão de uma triplicata e são representativos de dois experimentos independentes. Para análise estatística, foi feita comparação das médias dos grupos por ANOVA, seguido do teste de Tukey (* $p < 0,05$).

4.4 Capítulo IV

Avaliação e caracterização da interação dos candidatos vacinais selecionados com componentes do hospedeiro

O interesse em analisar proteínas de membrana externa se deve pelo alto potencial que essas apresentam em participar das interações patógeno-hospedeiro. Uma vez que essas proteínas estão localizadas na superfície da bactéria elas podem desempenhar várias funções, como serem adesinas, alvo para anticorpos, receptores para várias moléculas do hospedeiro e ainda, podem atuar como porinas. No caso das leptospiros patogênicas, as interações dessas proteínas com o hospedeiro são cruciais para neutralizar a resposta imune do hospedeiro e, com isso, promover a invasão e colonização da bactéria para vários órgãos e tecidos. Por esse motivo, a caracterização de proteínas expostas na superfície é fundamental não apenas para o conhecimento dos mecanismos de patogenicidade das leptospiros, mas também para o desenvolvimento de antígenos para diagnóstico e identificação de candidatos com potencial para uso em vacinas. Como os dados obtidos até o momento mostraram que os genes selecionados quando codificados em proteínas apresentam grandes probabilidades de estarem expostos na superfície das leptospiros e presentes durante a infecção, o próximo passo foi avaliar se essas proteínas contribuem de alguma maneira para a patogenicidade da bactéria. Neste capítulo, apresentamos a adesão das proteínas rLIC13479, rLIC10050 e rLIC10537 a componentes da matriz extracelular do hospedeiro e suas interações com componentes do plasma humano. Além disso, a ligação das proteínas a essas moléculas foram caracterizadas com intuito de demonstrar a importância dessas ligações.

4.4.1 Avaliação e caracterização do potencial que as proteínas apresentam como ligantes a componentes da matriz extracelular

4.4.1.1 Adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular

Como a adesão a células e aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro é uma das propriedades fundamentais no processo de infecção, essa etapa do trabalho visa avaliar as propriedades das proteínas rLIC13479, rLIC10050 e fragmentos recombinantes gerados a partir da LIC10537 quanto à sua capacidade de interação com componentes da matriz extracelular. Para isso, laminina, fibronectina celular, elastina, colágeno tipo I, colágeno tipo IV e as proteínas controles BSA e fetuína foram imobilizados em placas de microdiluição e a ligação das proteínas recombinantes foi avaliada por ELISA, após o uso dos anticorpos policlonais obtidos contra cada proteína recombinante.

Os resultados apresentados na Figura 31, demonstram que todos os recombinantes apresentaram ligação a laminina. No entanto, apenas as proteínas rLIC13479 e rLIC10050 foram capazes de interagir de forma significativa quando comparada com os controles negativos BSA e fetuína, que demonstra ausência de interação. Por esse motivo, as proteínas rLIC13479 e rLIC10050 foram nomeadas respectivamente de Lsa46 e Lsa77, que corresponde a *Leptospiral surface adhesin* e seu respectivo peso molecular (Figura 31 A). Portanto, de agora em diante, as proteínas serão sempre referidas por suas novas nomeações. Para confirmar se de fato a ligação desses componentes às proteínas Lsa46 e Lsa77 é específica, anticorpos monoclonais anti-his foram utilizados. Os resultados obtidos mostram que ambas as proteínas recombinantes foram capazes de interagir de forma significativa com esse componente, confirmando que essa interação ocorre de forma bastante específica (Figura 31B). Embora a ligação dos fragmentos gerados a partir da LIC10537 com laminina não tenha sido significativa (Figura 31 C), mas como aparentemente a ligação com o fragmento 2 foi mais expressiva, a interação entre essas duas moléculas também foi analisada com anticorpos monoclonais anti-his. Resultados semelhantes foram obtidos e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada (Figura 31 D).

Várias proteínas de leptospiros com propriedades de ligação específica a laminina e a outros componentes da ECM foram identificadas pelo nosso grupo (ATZINGEN et al., 2008; ATZINGEN et al., 2009; BARBOSA et al., 2006; DOMINGOS et al., 2015; DOMINGOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2014; FERNANDES et al., 2012; LONGHI et al., 2009; MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010; SIQUEIRA et al.,

2013; SOUZA et al., 2012; VIEIRA et al., 2010b). Outros grupos também identificaram proteínas com capacidade de adesão (CARVALHO et al., 2009; CHOY et al., 2007; HAUKE et al., 2008; HOKE et al., 2008; LIN et al., 2009; PINNE; CHOY; HAAKE, 2010; STEVENSON et al., 2007). De maneira geral, esses dados demonstram o potencial que as leptospiros patogênicas apresentam em aderir nas células do hospedeiro a fim de estabelecer uma infecção.

Figura 31 – Interação das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular. Placas de ELISA foram imobilizadas com 1 µg de laminina, colágeno tipo I e VI, fibronectina celular, elastina e com os controles negativos BSA e fetúina. No dia seguinte, 1 µg das proteínas Lsa46 e Lsa77 (A) fragmentos gerados da LIC10537 (C) foram adicionados por poço e as placas foram incubadas por 2 horas a 37 °C. A detecção da ligação foi feita com o antissoro obtido respectivo a cada proteína recombinante seguida de incubação com anti-IgG de camundongo (1:3000). A ligação a laminina foi confirmada pelo uso de anticorpos monoclonais anti-his (B) corresponde às análises das proteínas Lsa46 e Lsa77, (D) corresponde ao fragmento2 da LIC10537. Os dados representam o valor da média das absorvâncias em 492 nm ± desvio padrão de uma triplicata e são representativos de três experimentos independentes. Para análise estatística, a ligação das proteínas foi comparada aos controles negativos, pelo teste t-Student (*p<0,05 e **p<0,01).

4.4.1.2 Afinidade de ligação das proteínas Lsa46 e Lsa77 à laminina

Com o intuito de verificar a afinidade de ligação das proteínas recombinantes à laminina, um ensaio de ELISA foi realizado para obtenção de uma curva de dose-resposta, na qual uma concentração fixa de componente imobilizado foi incubada com concentrações crescentes das proteínas recombinantes. Os resultados obtidos mostram que tanto Lsa46 como Lsa77 se ligaram de forma dose-dependente e saturável à laminina. O nível de saturação da ligação foi atingida em torno de 1500 nM e 3000 nM, respectivamente (Figura 32 A e B). Assim, a constante de dissociação pode ser calculada, e os valores obtidos da interação foram $24,3 \pm 17$ nM para Lsa46 e 53 ± 17 nM para Lsa77. Valor dessa magnitude foi observado por Oliveira e colaboradores (2011) quando caracterizaram o perfil de ligação da proteína Lsa66 com laminina. Interessante ressaltar que essa proteína apresenta o domínio *OmpA-like* semelhante as proteínas do presente estudo. Além disso, quando fragmentos recombinantes da Lsa66 foram gerados com intuito de investigar o fragmento responsável por essa ligação, foi demonstrado que o fragmento intermediário e o fragmento C-terminal foram os responsáveis pela ligação (OLIVEIRA et al., 2014). Como o fragmento intermediário carrega uma porção da região C-terminal, talvez a ligação observada para essas proteínas estejam mais associada a essa região, visto que Loa22, outra proteína que contém domínio *OmpA-like*, não interage com ECM.

Em relação ao fragmento 2 da LIC10537, apesar da ligação apresentada não ser significativamente estatística, foi realizado uma curva de dose-resposta para confirmar de fato a ausência de ligação. Os resultados obtidos mostram que embora a ligação tenha sido dose-dependente, quando concentrações crescentes da proteína recombinante foram adicionadas (0 a 5000 nM), a saturação não foi obtida, o que demonstra baixa afinidade de ligação (Figura 32 C).

Figura 32 – Dose-resposta da ligação das proteínas recombinantes à laminina. Experimentos de dose-resposta foram realizados com as proteínas recombinantes Lsa46 (A), Lsa77 (B) e fragmento 2 da LIC10537 (C), onde concentrações crescentes destas proteínas foram incubadas com 1µg de laminina imobilizada em placa de ELISA. A detecção da ligação foi feita com antissoro respectivo a cada proteína e, em seguida, foi adicionado anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:3000). O BSA foi utilizado como controle negativo. Cada ponto foi realizado em triplicata e expresso como a média dos valores das absorbâncias em 492 nm.

4.4.1.3 Efeito dos anticorpos policlonais na ligação das proteínas recombinantes à laminina

Para verificar se as regiões imunogênicas das proteínas estão envolvidas na ligação das proteínas Lsa46 e Lsa77 à laminina, os anticorpos gerados contra cada proteína recombinante foram pré-incubados com a respectiva proteína e, em seguida, a interferência na ligação foi verificada por ELISA. O soro dos animais imunizados com PBS associado ao adjuvante hidróxido de alumínio foi usado como controle. Os resultados obtidos mostram que o antissoro correspondente tanto da Lsa46 quanto da Lsa77, ao bloquear os epitopos imunológicos, promoveu a inibição da ligação à laminina. Essa inibição foi dependente da diluição do soro, ou seja, quanto maior a concentração do soro menor a porcentagem de

ligação. No entanto, uma inibição total só foi obtida para a proteína Lsa46 (Figura 33 A). Quando essa mesma diluição foi utilizada para Lsa77, a maior porcentagem de inibição atingida foi de 50 % (Figura 33 B). Esses dados sugerem que, ao contrário do que foi observado para Lsa46, a interação de Lsa77 com laminina, além da participação das regiões imunogênicas, outras regiões também estão envolvidas. Resultados semelhantes têm sido observados para Lsa44 e Lsa45, outros ligantes de laminina (FERNANDES et al., 2014).

Figura 33 – Efeito dos anticorpos policlonais anti-Lsa46 e anti-Lsa77 na ligação das proteínas recombinantes à laminina. As proteínas recombinantes foram incubadas com diferentes diluições do antissoro específico ou com soro PBS (controle negativo). Em seguida, as proteínas bloqueadas foram adicionadas a placa de ELISA para interação com laminina previamente imobilizada. (A) para a proteína Lsa46 e (B) para a proteína Lsa77. A detecção da ligação foi feita com o anticorpo monoclonal anti-his. Os dados representam a porcentagem de ligação das proteínas recombinantes com laminina $\pm$ desvio padrão de uma triplicata e são representativos de dois experimentos independentes. A ligação foi comparada quando as proteínas foram incubadas na ausência dos anticorpos, considerado o máximo de ligação pelo teste t-Student (* $p < 0,05$).

4.4.1.4 Efeito das proteínas Lsa46 e Lsa77 desnaturadas na ligação à laminina

Com o objetivo de avaliar a importância da estrutura proteica na interação com laminina, as proteínas Lsa46 e Lsa77 foram submetidas a altas temperaturas para promover sua desnaturação. Em seguida, a interação destas proteínas com laminina foi analisada por ELISA. Os resultados mostram uma redução de aproximadamente 50 % na ligação de Lsa46 com laminina, o que sugere a importância de regiões estruturadas para essa interação. No entanto, como essa interação não foi abolida totalmente, possivelmente epítopos não conformacionais também fazem parte dessa interação. Essa mesma faixa de redução foi observada para a proteína de *L. interrogans* Lsa32 quando experimentos similares foram realizados (DOMINGOS et al., 2015). Em relação à proteína Lsa77, a ligação também foi afetada após o processo de desnaturação, porém a redução da ligação foi menos expressiva (Figura 34).

Figura 34 – Efeito da interação das proteínas desnaturadas à laminina. As proteínas Lsa46 (A) e Lsa77 (B) foram submetidas a 96° C por 10 minutos para serem desnaturadas, em seguida 1µg de cada proteína foi adicionada em placa de ELISA para interação com laminina previamente imobilizada. A detecção da ligação foi feita com o anticorpo policlonal obtido contra cada proteína recombinante seguido do uso de anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Os dados representam a porcentagem de ligação das proteínas recombinantes com laminina $\pm$ desvio padrão de uma triplicata e são representativos de dois experimentos independentes. As proteínas recombinantes que não passaram pelo processo de desnaturação foram consideradas como 100 % de ligação, por isso essa situação foi utilizada para comparação da ligação com as proteínas desestruturadas, pelo teste t-Student (* $p < 0,05$).

4.4.1.5 Efeito da ligação das *L. interrogans* à laminina na presença das proteínas recombinantes

Para verificar se as proteínas Lsa46 e Lsa77, quando ligadas à laminina, apresentam a capacidade de interferir na ligação das leptospiros vivas a este componente, um ensaio de ELISA foi realizado, no qual concentrações crescentes das proteínas recombinantes foram adicionadas à placa previamente fixada com laminina, seguido da incubação com as leptospiros. A detecção das leptospiros ligadas foi feito de forma indireta após o uso de um antissoro obtido contra uma proteína majoritária presente na superfície da bactéria. Como observado na Figura 35, nenhuma redução significativa foi notada na ligação das leptospiros a laminina, mas o contrário foi observado para Lsa46 quando concentrações crescentes de 1,25 e 2,5 µg dessa proteína foram adicionadas, um aumento na ligação foi observado. No entanto, esse aumento não foi notado na maior concentração de proteína utilizada, o que sugere que alguma reação inespecífica tenha ocorrido. De qualquer forma, foi verificado também por outros autores que a adição da proteína OmpL37, em quantidade saturável, não afeta a ligação de *L. interrogans* à elastina, um outro componente da matriz extracelular (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010). Por outro lado, algumas proteínas analisadas foram capazes de inibir, de forma moderada, a ligação de *L. interrogans* à laminina (DOMINGOS et al., 2012; MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011). Essa redução parcial observada nesses experimentos pode estar associado a redundância funcional apresentada pelas leptospiros, visto que uma série de receptores para laminina já foram identificados (VIEIRA et al., 2014).

Figura 35 – Interação das *L. interrogans* com laminina na presença das proteínas recombinantes. Concentrações crescentes de 1,25 µg, 2,5 µg e 5 µg das proteínas Lsa46 e Lsa77 foram adicionadas em placas de microdiluição previamente imobilizadas com laminina (1µg/poço), seguido da incubação com 10^7 *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20. A detecção da ligação foi feita após o uso de anticorpos policlonais anti-LipL32 e anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Os dados representam o valor da média das absorbâncias em 492 nm $\pm$ desvio padrão de uma triplicata e são representativos de dois experimentos independentes. Análise estatística foi realizada ao comparar a interação das leptopiras na ausência de proteína, pelo teste t-Student (* $p < 0,05$).

4.4.1.6 Importância dos resíduos de carboidratos na interação de laminina com as proteínas recombinantes

Devido às propriedades que o metaperiodato de sódio apresenta em oxidar grupamentos hidroxil presentes nos carboidratos, a importância desses resíduos na interação da laminina com as proteínas recombinantes foi avaliada. É importante ressaltar que a concentração de metaperiodato de sódio utilizada é suficiente apenas para oxidar os carboidratos presentes na superfície da laminina, por isso, a estrutura peptídica da molécula não é comprometida (WOODWARD; YOUNG; BLOODGOOD, 1985). Assim, a laminina foi incubada com concentrações crescentes desse sal e imobilizada em placa ELISA. Em seguida, as proteínas Lsa46 e Lsa77 foram adicionadas para verificar o perfil de ligação.

Os resultados encontrados revelam diferenças no padrão de ligação obtida para ambas às proteínas. Enquanto para Lsa77 nenhuma redução significativa foi notada na ligação com laminina, o contrário foi observado para Lsa46, onde a oxidação dos resíduos de carboidratos da laminina interferiu moderadamente nessa ligação. No entanto, como essa redução observada não foi dose-dependente e foi moderada mesmo com a maior concentração de

metaperiodato de sódio utilizada, sugere-se que, embora alguns resíduos de carboidratos presentes na laminina participem dessa interação, a ligação da Lsa46 à laminina não é totalmente dependente dessas estruturas. (Figura 36). Nossos achados foram semelhantes aos resultados obtidos por Fernandes e colaboradores (2012) com a proteína OmpL1, mas, difere dos dados encontrados para a maioria dos outros ligantes de laminina (ATZINGEN et al., 2008; BARBOSA et al., 2006; DOMINGOS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010). De qualquer forma, esses resultados indicam que nem todas as adesinas interagem com laminina na mesma região. A tabela 5 apresenta informações referentes às adesinas caracterizadas até agora pelo nosso grupo.

Figura 36 – Participação dos resíduos de carboidratos na interação de laminina com as proteínas recombinantes. 1 µg/poço de laminina foi incubada com concentrações crescentes de metaperiodato de sódio para oxidação dos carboidratos presentes na laminina. Em seguida, foi adicionada 1 µg/poço da proteína Lsa46 (A) e Lsa77 (B). A detecção da ligação foi feita após o uso de antissoro específico contra cada recombinante, seguido da incubação com anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Os dados representam o valor da média das absorbâncias em 492 nm $\pm$ desvio padrão de uma triplicata e são representativos de dois experimentos independentes. Para análise estatística, os valores de ligação para cada concentração de metaperiodato foram comparados com a situação na qual a laminina não foi incubada com metaperiodato de sódio, pelo teste t-Student (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

Tabela 5 – Comparação da afinidade de ligação das proteínas caracterizadas pelo nosso grupo

LIC*	Nome	ligantes	K _D (nM)	Efeito do Metaperiodato	Efeito do ACA	Geração de Plasmina	Ref
LIC13479	Lsa46	Laminina	24,3±17	Não	-	-	**
		Plasminogênio	26,2±11	-	Sim	Sim	
		Fibronectina	ND	-	-	-	
		Plasmática					
LIC10050	Lsa77	Laminina	53±17	Não	-	-	**
		Plasminogênio	ND	-	Sim	Sim	
		Fibronectina	ND	-	-	-	
		Plasmática					
LIC10537	Frag 2	Plasminogênio	ND	-	Sim	Sim	**
LIC12906	Lsa24	Laminina	ND	Sim	-	-	Barbosa et al, 2006 Verma et al., 2010
	Len A	Plasminogênio	ND	-	Sim	Sim	
LIC12690	Lp95	Laminina	ND	ND	-	-	Atzingen et al., 2009
		Fibronectina	ND	-	-	-	
LIC10368	Lsa21	Laminina	ND	Sim	-	-	Atzingen et al., 2008
		Fibronectina	ND	-	-	-	
		Colágeno IV	ND	-	-	-	
LIC10314	Lsa63	Laminina	ND	ND	-	-	Vieira et al., 2010
		Colágeno IV	ND	-	-	-	
LIC12099	LipL53	Laminina	ND	Sim	-	-	Oliveira et al., 2010
		Fibronectina	ND	-	-	-	
		Colágeno IV	ND	-	-	-	
LIC10258	Lsa66	Laminina	55±15	ND	-	-	Oliveira et al., 2011
		Fibronectina	290±11	-	-	-	
		Plasminogênio	68,8±25	-	ND	Sim	
LIC12880	Lp30	Plasminogênio	167±60	-	ND	Sim	Oliveira et al., 2011
LIC11087	Lsa30	Laminina	292±24	ND	-	-	Souza et al., 2012
		Fibronectina	157±35	-	-	-	
		Plasminogênio	ND	-	ND	Sim	
		C4BP	ND	-	-	-	
LIC10973	OmpL1	Laminina	2099±871	Não	-	-	Fernandes et al., 2012
		Fibronectina	1239±506	-	-	-	
		Plasminogênio	368±121	-	Sim	Sim	
LIC11469	Lsa20	Laminina	1988±563	ND	-	-	Mendes et al., 2011
		Plasminogênio	509±77,4	-	ND	Sim	
LIC12253	Lsa25	Laminina	415±203	Sim	-	-	Domingos et al., 2012
		C4BP	ND	-	-	-	
LIC11834	Lsa33	Laminina	367±248	Não	-	-	Domingos et al., 2012
		C4BP	ND	-	-	-	
		Plasminogênio	23,5±4,66	-	ND	Sim	
LIC11360	Lsa23	Laminina	25,1±4,1	ND	-	-	Siqueira et al., 2013
		Plasminogênio	11,7±1,4	-	Sim	Sim	
		Fibronectina	528±143	-	-	-	
		Fator H	ND	-	-	-	
		C4BP	17,6±3,5	-	-	-	
LIC11009	Lsa26	Laminina	952±418	ND	-	-	Siqueira et al., 2013
		Plasminogênio	6,4±2,5	-	Sim	Sim	
LIC11975	Lsa36	Laminina	120±97	ND	-	-	Siqueira et al., 2013
		Plasminogênio	17,8±5,5	-	Sim	Sim	
		Fibronectina	34,8±10	-	-	-	
LIC10645	Lsa44	Laminina	108±43,2	ND	-	-	Fernandes et al., 2014

		Plasminogênio	53,5±18,4	-	Sim	Sim	
LIC10731	Lsa45	Laminina	250,38	ND	-	-	Fernandes et al., 2014
		Plasminogênio	36,8±20,3	-	Sim	Sim	
LIC10829	Lsa32	Laminina	ND	ND	-	-	Domingos et al., 2015
		Plasminogênio	81,5±31,19	-	Sim	Sim	

**Leptospira interrogans* serovar Copenhageni L1-130 anotação no genoma (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>; Nascimento et al., 2004)

** proteínas do presente estudo

ND, não determinado

K_D, constante de dissociação

4.4.2 Avaliação e caracterização do potencial que as proteínas apresentam como ligantes a componentes do plasma humano

4.4.2.1 Interação das proteínas recombinantes com componentes do plasma

Outra estratégia utilizada por patógenos que permite o início de uma infecção consiste em sua habilidade de evasão do sistema imune do hospedeiro. Assim, a capacidade de interação desses patógenos com diferentes componentes do plasma é crucial para o estabelecimento da infecção. Nesse sentido, tem sido demonstrado que as leptospirosas patogênicas apresentam a capacidade de interagir com diferentes moléculas do hospedeiro, como PLG, fibrinogênio, vitronectina, fibronectina, FH e C4BP e, com isso, conseguem contornar as barreiras do hospedeiro a favor da sua sobrevivência e promover infecção. (BARBOSA et al., 2009; DA SILVA et al., 2015; MERI et al., 2005; MERIEN et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2013; VERMA et al., 2006; VIEIRA et al., 2009).

Como algumas proteínas presentes na superfície das leptospirosas têm sido identificadas como os receptores responsáveis por mediar essa interação, essa etapa do trabalho visa verificar se as proteínas do presente estudo atuam como receptores de algum componente do hospedeiro. Assim, a interação das proteínas Lsa46, Lsa77 e fragmentos gerados a partir da LIC10537 foram avaliados, por ELISA, com os seguintes componentes: PLG, fibronectina plasmática, vitronectina, fibrinogênio, C4BP e FH. Os resultados obtidos mostram que diferenças estatisticamente significativa foram observadas quanto à interação das proteínas Lsa46 e Lsa77 com fibronectina plasmática. No entanto, a interação dessas proteínas com o PLG parece ser mais consistente (Figura 37 A). Para confirmar se de fato a ligação desses componentes às proteínas ocorre de forma específica, anticorpos monoclonais anti-his foram utilizados. Os resultados obtidos confirmam essa interação e ainda, reforçam a consistência observada na ligação ao PLG (Figura 37 B).

Em relação aos fragmentos da LIC10537, apenas o fragmento 2 foi capaz de interagir de forma significativa com PLG e a especificidade de sua ligação também foi confirmada com anticorpos monoclonais (Figura 37 C e D). Interessante que Lsa66, outro receptor de PLG, quando foi avaliada a interação de seus fragmentos com PLG, apenas a porção intermediária foi responsável por mediar essa interação (OLIVEIRA et al., 2014), semelhante aos nossos dados onde houve ausência de ligação com o fragmento 1, que corresponde a porção N-terminal.

Tem sido demonstrado que esse mecanismo de interação com PLG contribui de forma significativa para a virulência de muitos patógenos, uma vez que esses organismos apresentam as propriedades de capturar o PLG do hospedeiro, convertê-lo em sua forma ativa e, em consequência disso, levar a degradação de componentes importantes que facilita o processo de invasão (BERGMANN; SCHOENEN; HAMMERSCHMIDT, 2013; FUCHS et al., 1994; KUUSELA; SAKSELA, 1990; LOTTENBERG et al., 1992). De fato, resultados obtidos pelo nosso grupo demonstram a capacidade de *L. interrogans* se ligar, por meio da interação com diferentes ligantes, ao PLG e levar a formação de plasmina, que por sua vez leva a degradação de moléculas de IgG e C3b (VIEIRA et al., 2012; VIEIRA et al., 2010a; VIEIRA et al., 2009).

Figura 37 – Interação das proteínas recombinantes a componentes do plasma. Placas de ELISA foram imobilizadas com 1 µg de plasminogênio, fibronectina plasmática, fibrinogênio, fator H, C4BP, vitronectina e com os controles negativos BSA e fetúina. No dia seguinte, 1 µg das proteínas Lsa46, Lsa77 (A) e fragmentos gerados a partir da LIC10537 (C) foram adicionados por poço e as placas foram incubadas por 2 horas a 37 °C. A detecção da ligação foi feita com o antissoro obtido respectivo a cada proteína recombinante seguido da incubação com anti-IgG de camundongo (1:3000). A ligação de Lsa46 e Lsa77 ao PLG e fibronectina plasmática foi confirmada pelo uso de anticorpos monoclonais anti-his (B), assim como, a ligação do PLG ao fragmento2 da LIC10537 (D). Os dados representam o valor da média das absorbâncias em 492 nm $\pm$ desvio padrão de uma triplicata e são representativos de três experimentos independentes. Para análise estatística, a ligação das proteínas foi comparada aos controles negativos, pelo teste t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$).

4.4.2.2 Afinidade de ligação das proteínas recombinantes ao PLG e fibronectina plasmática

As interações entre as proteínas recombinantes, o PLG e a fibronectina plasmática também foram avaliadas por uma curva de dose resposta. A ligação dose-dependente foi observada quando concentrações crescentes das proteínas Lsa46 e Lsa77 (0 - 3000 nM) foram incubadas com uma concentração fixa dos componentes (Figura 38). No entanto, a saturação só foi obtida para ligação da proteína Lsa46 com PLG (Figura 38 A). Assim, a constante de dissociação pode ser calculada e os valores obtidos da interação foram $26,2 \pm 11,7$ nM. Foi observado que a proteína de *Leptospira* Lsa33, é o único ligante de PLG que apresentou valores de mesma ordem de grandeza que Lsa46, e assim como nossa proteína, Lsa33 também

é ligante de laminina (DOMINGOS et al., 2012). No entanto, vale ressaltar que já foram descritos receptores com diferentes afinidades de ligação ao PLG (Tabela 5). Neste último caso, podemos incluir o fragmento 2 da LIC10537, visto que os resultados obtidos mostraram que embora a ligação tenha sido dose-dependente e com tendência a saturação, a mesma não foi atingida na faixa de concentração de proteína empregada (0 a 5000 nM) (Figura 38 C).

Figura 38 – Dose-resposta da ligação das proteínas recombinantes aos componentes do plasma. Experimentos de dose-resposta foram realizados com as proteínas recombinantes Lsa46 (A), Lsa77 (B) e fragmento 2 da LIC10537 (C) e PLG ou Lsa46 (D) e Lsa77 (E) e fibronectina plasmática. Os componentes imobilizados foram incubados com concentrações crescentes da proteína recombinante. A detecção da ligação foi feita com antissoro respectivo a cada proteína e, em seguida, foi adicionado anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:3000). O BSA foi utilizado como controle negativo. Cada ponto foi realizado em triplicata e expresso como a média dos valores das absorvâncias em 492 nm.

4.4.2.3 Efeito dos anticorpos policlonais na ligação das proteínas recombinantes ao PLG e fibronectina plasmática

A participação dos epitopos imunogênicos na interação das proteínas ao PLG e fibronectina plasmática também foi investigada após a incubação das proteínas recombinantes com antissoro específico. O soro dos animais imunizados com PBS associado ao adjuvante hidróxido de alumínio foi usado como controle da reação. Os resultados obtidos demonstram que os epitopos imunes participam tanto da ligação de Lsa46 como de Lsa77 com PLG, visto que uma redução significativa na porcentagem de ligação foi observada quando as proteínas foram bloqueadas com o soro homólogo (Figura 39 A e B). Em relação à ligação com a fibronectina plasmática, apenas a interação com a proteína Lsa46 apresentou algum efeito significativo (Figura 39 C). Em todos os casos, uma redução total da ligação foi observada apenas para a interação da proteína Lsa77 com PLG, o que sugere que essa interação depende dessas regiões imunogênicas ou de regiões próximas, que acabam por interferir nessa ligação. Esse mesmo padrão foi observado para a proteína Lsa36 de *L. interrogans* (SIQUEIRA et al., 2013). Nenhuma inibição significativa foi observada na ligação de Lsa77 com fibronectina plasmática, mesmo quando altas concentrações de antissoro foram utilizadas, sugerindo que outras regiões são responsáveis por essa interação (Figura 39 D). Dados similares foram relatados para a proteína recombinante OmpL37, onde nenhum efeito foi notado na ligação de fibronectina e outros componentes (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010). Por outro lado, resultados obtidos com a proteína Lsa23 de *L. interrogans* mostram a participação dos epitopos imunes como essencial para a interação com fibronectina (SIQUEIRA et al., 2013). Assim, os dados indicam que não existe um padrão único de interação, sugerindo a plasticidade de ligação dessas moléculas.

Figura 39 – Efeito dos anticorpos policlonais anti-Lsa46 e anti-Lsa77 na ligação das proteínas recombinantes ao PLG e fibronectina plasmática. As proteínas recombinantes foram incubadas com diferentes diluições do antissoro específico ou com soro PBS (controle negativo). Em seguida, as proteínas bloqueadas foram adicionadas a placa de ELISA para interação com os componentes previamente imobilizados. (A) e (C) se referem à ligação da proteína Lsa46 com PLG e fibronectina plasmática, respectivamente. (B) e (D) se referem à ligação da proteína Lsa77 com os mesmos componentes, respectivamente. A detecção da ligação foi feita com o anticorpo monoclonal anti-his. Os dados representam a porcentagem de ligação das proteínas recombinantes com os componentes $\pm$ desvio padrão de uma triplicata e são representativos de dois experimentos independentes. A ligação foi comparada quando as proteínas foram incubadas na ausência dos anticorpos, considerado o máximo de ligação pelo teste t-Student (* $p < 0,05$).

4.4.2.4 Efeito das proteínas Lsa46 e Lsa77 desnaturadas na ligação ao PLG e fibronectina plasmática

Novamente, com o objetivo de avaliar a importância da estrutura proteica na interação com os componentes do plasma, as proteínas Lsa46 e Lsa77 foram submetidas a altas temperaturas para promover sua desnaturação. Em seguida, a interação destas proteínas com PLG e fibronectina plasmática foi avaliada por ELISA. Os resultados obtidos demonstram que apenas a interação das proteínas com o PLG foi parcialmente comprometida pelo

processo de desnaturação, o que sugere a importância de regiões estruturadas para essa interação. No entanto, como esse comprometimento da interação não foi total, possivelmente epítopos não conformacionais também sejam importantes para a ligação dessas moléculas (Figura 40 A). Nenhuma diferença significativa foi observada com a ligação de Lsa46 e fibronectina plasmática. Já para Lsa77, ao invés do processo de desnaturação inibir sua interação com fibronectina, o efeito oposto foi observado, o que indica que a exposição a mais epítopos lineares favorece essa ligação (Figura 40 B). Resultado semelhante foi observado para ligação da proteína Lsa36 com PLG (SIQUEIRA et al., 2013).

Figura 40 – Efeito da ligação do PLG e fibronectina plasmática com as proteínas desnaturadas. As proteínas Lsa46 e Lsa77 foram submetidas a 96 °C por 10 minutos para serem desnaturadas, em seguida 1µg de cada proteína foi adicionada em placa de ELISA para interação com PLG (A) e fibronectina plasmática (B) previamente imobilizados. A detecção da ligação foi feita com o anticorpo policlonal obtido contra cada proteína recombinante seguido do uso de anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Os dados representam a porcentagem de ligação das proteínas recombinantes com os componentes $\pm$ desvio padrão de uma triplicata e são representativos de dois experimentos independentes. As proteínas recombinantes que não passaram pelo processo de desnaturação foi considerado como 100 % de ligação, por isso essa situação foi utilizada para comparação da ligação com as proteínas desestruturadas, pelo teste t-Student (* $p < 0,05$).

4.4.2.5 Efeito da ligação das *L. interrogans* ao PLG e a fibronectina plasmática na presença das proteínas recombinantes

Para verificar se as proteínas Lsa46 e Lsa77 interferem na ligação das leptospiros vivas ao PLG e a fibronectina plasmática, um ensaio de ELISA foi realizado. Concentrações crescentes das proteínas recombinantes foram adicionadas em placas previamente fixadas com estes componentes, seguido da incubação com as leptospiros. A detecção das leptospiros

ligada foi feito de forma indireta com o anticorpo policlonal anti-LipL32. Nenhuma redução significativa foi notada na ligação das leptospiros a estes componentes, o que já era esperado devido a redundância funcional apresentada pelas leptospiros (Figura 41). O fato das leptospiros apresentarem um repertório de receptores presentes em sua superfície dificulta a caracterização de alguma função específica. De fato, estudos realizados com mutantes para os genes *ligB* e *lipL32*, considerados moléculas importantes para virulência da bactéria, não apresentaram diferenças no padrão de infecção em modelo animal, quando comparado com a infecção causada por uma linhagem não mutada. Além disso, nenhuma diferença na ligação a componentes da matriz extracelular foi observada para *lipL32* mutada. Assim como, na ausência de *ligB* as leptospiros foram capazes de se aderir a células epiteliais (CRODA et al., 2008; MURRAY et al., 2009). Esses dados confirmam que a deleção de um único gene ou ensaios de competição com uma proteína específica não é suficiente para abolir uma dada função, uma vez que um efeito compensatório por outras proteínas deva existir.

Figura 41 – Interação das *L. interrogans* com PLG e fibronectina plasmática na presença das proteínas recombinantes. Concentrações crescentes de 1,25 µg, 2,5 µg e 5 µg das proteínas Lsa46 e Lsa77 foram adicionadas em placas de microdiluição previamente imobilizadas com estes componentes (1 µg/poço), seguido da incubação com 10^7 *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20. A detecção da ligação foi feita após o uso de anticorpos policlonais anti-LipL32 e anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Os dados representam o valor da média das absorvâncias em 492 nm $\pm$ desvio padrão de uma triplicata e são representativos de dois experimentos independentes. Análise estatística foi realizada ao comparar a interação das leptopiras na ausência de proteína, pelo teste t-Student.

4.4.2.6 Análise da participação dos resíduos de lisina na ligação das proteínas recombinantes ao PLG

Como já foi dito, o PLG é um zimógeno que é convertido à sua forma ativa por ativadores proteolíticos. A forma ativa do PLG é composta por duas cadeias, uma de 25 kDa e a outra de 65 kDa, que são ligadas por ponte dissulfeto. A cadeia pesada dessa molécula contém cinco domínios estruturais conhecidos como *kringle*. Esses domínios possuem sítios de ligação aos resíduos de lisina, e medeiam as interações do PLG e da sua forma ativa a substratos, reguladores e inibidores. Tem sido descrito na literatura que a interação de alguns patógenos com PLG ocorre por meio da ligação desses domínios *kringle*, via resíduos de lisina, de proteínas presentes na superfície dos patógenos (LAHTENMAKI; KUUSELA; KORHONEN, 2001; LIJNEN, 2001). O mesmo padrão de ligação foi observado quanto à interação de PLG com leptospiros patogênicos (VIEIRA et al., 2009). Assim, com o intuito de verificar se a ligação das nossas proteínas ao PLG ocorre via resíduos de lisina, um ensaio de ELISA foi realizado na presença de ácido aminocaproico (ACA), um análogo de lisina, para competir com a ligação das proteínas recombinantes.

Os resultados demonstrados sugerem que a ligação entre as proteínas Lsa46 (Figura 42 A), Lsa77 (Figura 42 B), fragmento 2 da LIC10537 (Figura 42 C) e o PLG de fato ocorre pela interação com os domínios *kringle* e os resíduos de lisina presentes nas proteínas, visto que essa interação foi bastante reduzida na presença do análogo de lisina. Nossos resultados vão de acordo com experimentos realizados pelo grupo que demonstram a participação desses domínios na ligação de diferentes proteínas de *L. interrogans* (DOMINGOS et al., 2015; FERNANDES et al., 2012; VIEIRA et al., 2010a). Dados na literatura demonstram ainda que os resíduos de lisina presentes na região C-terminal das proteínas atuam, preferencialmente, na interação ao PLG (MILES et al., 1991). Interessante que no nosso trabalho, apenas o fragmento 2 da LIC10537, que corresponde a porção C-terminal, foi capaz de se ligar ao PLG.

Figura 42 – Efeito do ácido aminocaproico (ACA) na ligação das proteínas recombinantes ao PLG. Placas de ELISA foram previamente imobilizadas com PLG (1 µg/poço). Em seguida, as proteínas Lsa46 (A), LSA77 (B) e fragmento 2 da LIC10537 (C) foram adicionadas na presença (2 e 20 mM) ou ausência (0 mM) do análogo de lisina ACA. A detecção da ligação das proteínas ao PLG foi feita por meio da utilização de antissoro específico contra cada proteína seguida da incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Os dados representam o valor da média das absorbâncias em 492 nm ± desvio padrão de uma triplicata e são representativos de dois experimentos independentes. Análise estatística foi realizada pelo teste t-Student e a comparação feita em relação ao tratamento sem inibição (*p<0,05).

4.4.2.7 Conversão do plasminogênio à plasmina na presença das proteínas recombinantes

Do ponto de vista do patógeno, a interação com o sistema fibrinolítico do hospedeiro é benéfico para promoção da infecção. Nesse sentido, dados da literatura tem demonstrado a capacidade de interação de vários patógenos com esse sistema (BERGMANN; HAMMERSCHMIDT, 2007; COLEMAN et al., 1995; FENNO et al., 2000; LAHTENMAKI; KUUSELA; KORHONEN, 2001). De forma não diferente, essa capacidade de se ligar ao PLG e gerar a sua forma ativa, na presença de um ativador, também foi demonstrado pelo nosso grupo para as leptospiros (VIEIRA et al., 2009). Além disso, um grande repertório de receptores responsáveis por essa interação já foi identificado (VIEIRA; NASCIMENTO, 2015).

Assim, com o objetivo de verificar se as proteínas Lsa46, Lsa77 e fragmento 2 da LIC10537, quando ligadas ao PLG, são capazes de convertê-lo à sua forma ativa, placas de microdiluição foram tratadas com as respectivas proteínas recombinantes e incubadas com PLG. Em seguida, um ativador de PLG tipo uroquinase (uPA) foi adicionado juntamente com um substrato cromogênico específico para plasmina. A atividade da plasmina foi medida indiretamente pela clivagem do substrato a 405 nm. Os resultados obtidos sugerem que o PLG ligado as proteínas Lsa46 (Figura 43 A), Lsa77 (Figura 43 B) e fragmento 2 da LIC10537 (Figura 43 C) podem ser convertidos em plasmina. BSA que não liga a PLG, por isso não apresenta atividade proteolítica, foi utilizado como controle negativo da reação. Nenhuma clivagem foi observada também para os controles onde algum componente foi omitido da reação. A capacidade de PLA ser gerada na superfície da bactéria é uma estratégia interessante, porque permite a degradação de componentes do hospedeiro facilitando os processos de invasão e disseminação do patógeno (VIEIRA; NASCIMENTO, 2015). Assim, os dados obtidos sugerem que as proteínas selecionadas no presente estudo apresentam características interessantes que podem contribuir para a patogênese das leptospiros.

Figura 43 – Ativação do PLG ligado às proteínas recombinantes. A geração de plasmina pelo plasminogênio ligado às proteínas Lsa46 (A), Lsa77 (B) e fragmento 2 da LIC10537 (C) foi avaliada indiretamente pelo uso de um substrato cromogênico. Inicialmente, as proteínas foram imobilizadas (1 µg/poço) em placas de microdiluição, em seguida, foram incubadas com PLG na presença de um ativador do PLG (uPA) e um substrato específico ou foram incubadas na ausência de algum componente para verificar a especificidade da reação. BSA, que não liga ao PLG, foi empregado como controle negativo da reação. Os dados representam o valor da média das absorvâncias em 405 nm, como uma medida da clivagem do substrato, $\pm$ desvio padrão de uma triplicata e são representativos de dois experimentos independentes. A significância estatística é dada em relação ao BSA, por teste t-Student (** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$).

4.4.3 Avaliação da interferência entre os componentes na ligação com as proteínas recombinantes

4.4.3.1 Competição entre o PLG, laminina e fibronectina na ligação à Lsa46 e Lsa77

Como as proteínas Lsa46 e Lsa77 apresentaram a capacidade de se ligar a três moléculas diferentes do hospedeiro, essa etapa do trabalho visa avaliar se estas moléculas competem pelo mesmo sítio de ligação ou interferem de alguma maneira na ligação das proteínas recombinantes. Assim, as proteínas Lsa46 e Lsa77 foram imobilizadas em placas de ELISA, em seguida, um componente foi adicionado em uma concentração fixa, enquanto o outro foi adicionado em concentrações crescentes, para assim, verificar a interferência na ligação. A detecção da reação foi feita com anticorpos específicos contra cada componente em questão. Os resultados obtidos revelam que para a proteína Lsa46, laminina não compete pelo mesmo sítio de ligação ao PLG e o contrário também é verdadeiro, visto que nenhuma interferência significativamente estatística foi observada. Já para Lsa77, uma interferência na ligação do PLG foi notada mesmo com a menor concentração de laminina utilizada. No entanto, o PLG não foi capaz de interferir na ligação da laminina a esta proteína, sugerindo que essas moléculas não competem pelo mesmo sítio de ligação (Figura 44 A e B). Em relação à interferência promovida por laminina na ligação de fibronectina plasmática às proteínas Lsa46 e Lsa77, ao invés dessa associação promover uma redução ou não alterar a porcentagem de ligação, um aumento na ligação foi notado (Figura 44 C). Dados semelhantes foram observados na interação de PLG com laminina frente à ligação com OmpL1, sugerindo que, esses componentes além de apresentarem sítios distintos de ligação, ambos se ligam a proteína recombinante. Assim, é possível que o componente excedente possa se ligar ao outro componente, e por estar ligado à proteína, favorece um aumento de sinal da reação (FERNANDES et al., 2012). Para as demais situações analisadas, nenhuma competição na ligação às proteínas foi observada, indicando que a interação desses componentes com Lsa46 e Lsa77 ocorre por meio de sítios distintos. O mesmo caso foi observado para a interação da proteína LcpA com outros componentes do hospedeiro (DA SILVA et al., 2015). Possivelmente, o fato da interação entre os componentes e as proteínas ocorrer via sítios distintos, se deve a alguma estratégia utilizada por leptospiros para um estabelecimento mais eficiente da infecção.

Figura 44 – Interferência entre PLG, laminina e fibronectina na ligação as proteínas recombinantes. Teste de inibição competitiva foi realizado em quédiferentes concentrações de laminina (0-1 μg/poço) e uma concentração fixa de 1 μg/poço de PLG (A), diferentes concentrações de PLG (0-1 μg/poço) e uma concentração fixa de 1 μg/poço de laminina (B), diferentes concentrações de laminina (0-1 μg/poço) e uma concentração fixa de 1 μg/poço de fibronectina plasmática (C), diferentes concentrações de fibronectina plasmática (0-1 μg/poço) e uma concentração fixa de 1 μg/poço de PLG (D), diferentes concentrações de fibronectina plasmática (0-1 μg/poço) e uma concentração fixa de 1 μg/poço de laminina (E), diferentes concentrações de PLG (0-1 μg/poço) e uma concentração fixa de 1 μg/poço de fibronectina plasmática (F) foram adicionados em placa de ELISA previamente fixados com as proteínas Lsa46 e Lsa77. A detecção foi feita com anticorpos específicos contra cada componente fixo, seguido do uso de anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Os dados representam a porcentagem de ligação das proteínas recombinantes com os componentes $\pm$ desvio padrão de uma triplicata e são representativos de dois experimentos independentes. Análise estatística foi realizada pelo teste t-Student e a comparação feita em relação ao tratamento contendo apenas o componente com a concentração fixa (* $p < 0,05$).

4.5 Capítulo V

Avaliação do potencial vacinal dos candidatos selecionados em modelo animal

A busca por antígenos vacinais capazes de proteger contra leptospirose é um campo de intensa pesquisa. O grande interesse no desenvolvimento de uma vacina eficiente se deve ao fato que as vacinas atualmente disponíveis apresentam uma série de características indesejáveis. Essas vacinas, que consistem em leptospirosas inativadas ou preparações de membrana, semelhante às vacinas veterinárias, conferem proteção somente contra os sorovares presentes na preparação e ainda, falham em montar uma resposta imunológica duradoura, sendo necessário reforço vacinal a cada 6 ou 12 meses. Além disso, efeitos colaterais observados após a sua administração, levam a desistência desse reforço, deixando o indivíduo novamente susceptível à doença. Por esses motivos, essas vacinas conhecidas como *bacterinas*, são pouco utilizadas na população. Além disso, no Brasil, não existem vacinas licenciadas para uso humano. Nesse sentido, a busca por novas estratégias vacinais são necessárias. Atualmente, o foco das pesquisas está na identificação de antígenos recombinantes que sejam conservados e capazes de promover uma resposta imunológica protetora. Assim, essa etapa do trabalho visa avaliar o potencial vacinal das proteínas recombinantes.

Neste capítulo, apresentamos o perfil de ativação da resposta imune, humoral e celular, obtida após a imunização dos camundongos BALB/c com as proteínas recombinantes. Como é sabido que a eficiência de uma vacina depende da presença de bons adjuvantes, fizemos o uso de dois adjuvantes conhecidos: hidróxido de alumínio e MPLA. Estes foram utilizados com o intuito de promover uma resposta imune elevada e modulação do sistema imune quando associado aos antígenos recombinantes. Em seguida, o potencial imunoprotetor dos candidatos selecionados foi avaliado frente a um ensaio de desafio, realizado com uma cepa virulenta de *L. interrogans*, em hamsters. Nessa etapa, diferentes adjuvantes também foram utilizados na tentativa de direcionar a resposta imune obtida para uma resposta protetora, e, conseqüentemente, contribuir para a sobrevivência dos animais.

4.5.1 Avaliação da resposta imune obtida para os candidatos vacinais em camundongos BALB/c

4.5.1.1 Avaliação da resposta imune humoral específica para os candidatos vacinais

Como já é bem descrito na literatura, o sucesso no controle de algumas doenças tem sido obtido pela indução de anticorpos protetores. Esse fato também é verdadeiro para leptospirose, visto que a proteção obtida pelas vacinas inativadas é mediada por anticorpos contra o LPS da bactéria (BHARTI et al., 2003). No entanto, foi observado que a presença de altos títulos de anticorpos anti-LPS em gados não foi capaz de promover proteção após um desafio experimental, sugerindo que anticorpos direcionados a outros componentes da membrana das leptospiros também sejam necessários para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora (BOLIN; ZUERNER; TRUEBA, 1989). Além disso, como as leptospiros são bactérias extracelulares, a ativação de uma resposta imune humoral certamente é fundamental.

Assim, essa etapa do trabalho visa avaliar se as proteínas Lsa46, Lsa77 e fragmentos gerados a partir da LIC10537 são capazes de estimular o sistema imune de camundongos BALB/c de forma específica contra cada proteína recombinante. Para atingir tal objetivo, os animais foram imunizados três vezes, por via subcutânea, com a seguinte formulação vacinal: 10 µg de cada proteína recombinante associadas aos adjuvantes *Alhydrogel* 2 % (referido como Alum) ou MPLA derivado de *Bordetella pertussis* (RAW et al., 2006). Os animais do grupo controle foram imunizados com PBS associado ao hidróxido de alumínio. Duas semanas após cada dose, esses animais foram sangrados, via plexo retro-orbital, e os soros obtidos foram avaliados quanto a produção de anticorpos IgG específicos.

Os dados apresentados na Figura 45 mostram que todas as proteínas recombinantes foram capazes de induzir a formação de anticorpos específicos. No entanto, a capacidade de ativação da resposta imune foi variada entre as diferentes formulações testadas. De fato, tem sido demonstrado que algumas proteínas recombinantes de *Leptospira* são mais imunogênicas do que outras (HARTWIG et al., 2011). No presente estudo, os dados obtidos para a proteína Lsa77 merecem destaque devido ao alto potencial imunogênico observado (Figura 45 B). Além disso, foi à única proteína que apresentou altos títulos de anticorpos quando administrada com MPLA, títulos esses, superiores ao que foi encontrado para a formulação contendo Alum. Interessante que o Alum é amplamente conhecido por estimular uma resposta imune humoral, enquanto adjuvantes derivados de LPS como o MPLA, têm sido associados com a indução de uma resposta imune celular. No entanto, como o MPLA derivado de *B.*

pertussis apresenta uma estrutura diferente do MPLA de *Salmonella*, talvez, esses adjuvantes possam apresentar propriedades distintas de ativação. Quando MPLA de *B.pertussis* foi avaliado em vacinas para influenza, uma resposta imune equilibrada (*Th1/Th2*) foi observada (QUINTILIO et al., 2009). Já foi demonstrado que em alguns casos o direcionamento da resposta imune de MPLA para o padrão *Th1* depende tanto do tipo de antígeno como da via de administração, indicando que esse adjuvante tem uma forte tendência, mas não exclusiva, em promover um padrão *Th1* de resposta (CASELLA; MITCHELL, 2008). Por fim, a tabela 6 mostra os títulos de anticorpos obtidos após a administração da terceira dose das vacinas. Os títulos dos anticorpos obtidos após as imunizações com o grupo controle foram considerados como a primeira diluição utilizada (dados não mostrados).

Figura 45 – Produção de IgG total em camundongos BALB/c imunizados com os candidatos vacinais. Os animais foram imunizados por via subcutânea com 10 µg das proteínas Lsa46 (A), Lsa77 (B), fragmento 1 (C) e fragmento 2 (D) da LIC10537 associados aos adjuvantes Alum ou MPLA. Após 15 dias de cada dose, os animais foram sangrados e os títulos dos anticorpos obtidos foram avaliados por ELISA. 250 ng de cada proteína recombinante foram imobilizadas em placas de microdiluição, em seguida, foram adicionadas diluições seriadas dos antissoros obtidos. A detecção foi feita com anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Os dados representam a média do título de 5 animais $\pm$ desvio padrão.

Tabela 6 – Títulos de anticorpos IgG obtidos após as imunizações com as formulações vacinais

Proteína recombinante	Formulação vacinal	Título - 3º Sangria
rLIC13479	Lsa46 + Alum	20.000
	Lsa46 + MPLA	14.000
rLIC10050	Lsa77 + Alum	92.000
	Lsa77 + MPLA	307.000
rLIC10537	Fragmento 1 + Alum	14.000
	Fragmento 1 + MPLA	9.000
	Fragmento 2 + Alum	66.000
	Fragmento 2 + MPLA	6.000

4.5.1.2 Avaliação da resposta imune celular específica para os candidatos vacinais selecionados

Avanços obtidos no estudo da resposta imunológica mostram que uma vacina para ser considerada eficiente precisa ativar linfócitos T auxiliares. Uma vez ativadas, essas células T podem desempenhar várias funções, tais como, ativação de linfócitos B para produção de anticorpos específicos, ativação de células citotóxicas que podem desempenhar suas atividades de forma mais potente e, ainda, a geração de células de memória que são fundamentais pelo fato de serem rapidamente ativadas após uma segunda exposição ao antígeno (KALIL et al., 2008). Embora as vacinas inativadas para leptospirose sejam consideradas eficientes, elas falham na geração de uma resposta de memória e na capacidade de eliminação total da bactéria, visto que alguns animais imunizados ainda eliminam leptospiros no ambiente, o que contribui para os processos de contaminação. Possivelmente, essas falhas observadas estão associadas com uma ativação ineficiente das células T.

Assim, com o objetivo de verificar se as formulações vacinais testadas são capazes de estimular essas células, animais imunizados foram sacrificados e seus baços foram retirados para avaliação da proliferação celular após estimulação *in vitro* com as proteínas recombinantes. A proteína concanavalina A (ConA) foi utilizada como controle positivo, devido a alto potencial de estimular as células imune. Enquanto que as células dos animais imunizados com PBS ou incubadas apenas com o meio foram utilizadas como controle negativo. A proliferação celular foi avaliada de forma indireta pela incorporação de um análogo de timidina, o BrdU. A detecção dessa molécula incorporada foi feita por ELISA com anticorpos específicos.

Os resultados obtidos mostram que as proteínas Lsa46 e Lsa77 foram capazes de estimular *in vitro* a proliferação celular quando comparado com a proliferação obtida pelas células dos animais imunizados e que receberam apenas meio como estímulo (Figura 46 A). No entanto, dados significativos foram obtidos apenas para o grupo de animais imunizados com Lsa46 associada aos adjuvantes, Alum e MPLA, e para o grupo imunizado com Lsa77+MPLA. Interessante notar que a formulação Lsa77+MPLA que apresentou maior título de anticorpos IgG, foi a que também apresentou um maior índice de estimulação. A tabela 7 mostra o índice de estimulação obtido para todas as formulações testadas. Em relação aos fragmentos gerados a partir da LIC10537, nenhuma diferença significativa foi observada (Figura 46 B). O controle positivo utilizado ConA, mitógeno de ativação de células T, apresentou níveis superiores de proliferação, indicando a funcionalidade dos experimentos. Assim, os dados obtidos sugerem que os candidatos vacinais Lsa46 e Lsa77 podem ativar uma resposta imune celular específica. De forma semelhante a outras adesinas identificadas em leptospiros que também apresentaram essa propriedade (FERNANDES et al., 2014; FERNANDES et al., 2012).

Figura 46 – Avaliação *in vitro* da proliferação de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com os candidatos vacinais. A proliferação celular foi analisada a partir de células de baço de camundongos imunizados com Lsa46+Alum, Lsa46+MPLA, Lsa77+Alum, Lsa77+MPLA, fragmento1+Alum, fragmento 1+MPLA e fragmento 2+Alum, fragmento 2+MPLA ou imunizados com PBS+Alum, como controle. As células foram cultivadas e então estimuladas com meio (controle negativo), 5µg/mL de ConA (controle positivo) ou com a proteína específica (5 µg/mL). A resposta de proliferação foi medida por ELISA pelo ensaio colorimétrico BrdU. Os dados representam o valor da média das absorvâncias em 450 nm ± desvio padrão de uma triplicata. As comparações para análise estatística foram feitas pelo teste t-Student entre o grupo de animais imunizados que receberam os seguintes estímulos *in vitro*: proteína e meio (*p<0,05) ou entre os grupos de animais imunizados com as proteínas e PBS, e posteriormente, estimulados *in vitro* com as respectivas proteínas (#p<0,05).

Tabela 7 – Índice de estimulação

Proteína recombinante	Formulação vacinal	Índice de estimulação
rLIC13479	Lsa46 + Alum	3,99
	Lsa46 + MPLA	2,95
rLIC10050	Lsa77 + Alum	0
	Lsa77 + MPLA	6,65

4.5.1.3 Dosagem de citocinas secretadas no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com os candidatos vacinais

O interesse em analisar as citocinas secretadas se deve pelo fato de que podemos obter indícios sobre o padrão de resposta imune gerada, uma vez que as citocinas TNF- α , IL-12 e IFN- γ estão associados com o padrão *Th1* da resposta imune, enquanto que IL-4 e IL-10 estão associados com o padrão *Th2*. Assim, com o intuito de verificar o padrão de resposta imune promovido pelas diferentes formulações vacinais, o sobrenadante dos esplenócitos cultivados foi avaliado para a presença de citocinas secretadas. A dosagem de TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-4 e IL-10 foi realizada por ELISA, e os valores obtidos foram comparados com os valores de uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de cada citocina.

Os dados obtidos na Figura 47 mostram a presença de IFN- γ , TNF- α e IL-10 no sobrenadante das células dos animais imunizados com Lsa46+Alum e estimulados com a respectiva proteína. Já para o grupo de animais imunizados com Lsa46+MPLA, além da presença de TNF- α e IL-10, níveis significativos de IL-4 também foram encontrados. Interessante notar que a detecção de IFN- γ e os altos níveis de TNF- α observados para Lsa46+Alum, possivelmente, contribuíram para uma maior proliferação celular neste grupo, diferente do que foi observado para o grupo Lsa46+MPLA, onde os baixos níveis detectados de TNF- α e ausência de IFN- γ levou a uma menor taxa de proliferação celular. Talvez, essa inibição observada foi dada por IL-4, visto que níveis elevados desta citocina foram achados. De maneira geral, a presença tanto de citocinas pró-inflamatórias como anti-inflamatórias encontrada nesses dois grupos pode promover uma modulação da resposta imune e, assim, gerar uma resposta equilibrada (*Th1/Th2*). Dados na literatura mostram que para uma eliminação eficiente das leptospiros durante um processo infeccioso, citocinas inflamatórias devem ser induzidas rapidamente. No entanto, essa produção deve ser estritamente regulada, porque a exposição prolongada a estas citocinas pode promover dano tecidual (CHIRATHAWORN; KONGPAN, 2014). Como a regulação das citocinas inflamatórias por citocinas anti-inflamatórias é fundamental para gerar equilíbrio na resposta imune, o perfil da resposta imunológica obtida para essas formulações vacinais é bem interessante.

Em relação ao grupo imunizado com a proteína Lsa77+Alum, quando as células destes animais foram estimuladas *in vitro* e o sobrenadante analisado quanto à presença de citocinas, IFN- γ , IL-10 e IL-4 foram encontrados. No caso de Lsa77+MPLA, apenas IL-10 foi detectada em baixas concentrações. A ausência de detecção de citocinas inflamatórias, TNF- α , IL-12 e IFN- γ , sugere o envolvimento de outra subpopulação de células T, uma vez que as células

desse grupo apresentaram o maior índice de proliferação. Possivelmente, a subpopulação de células ativadas nesse grupo foi *Th17*, dada a capacidade que apresentam em produzir outras citocinas, como IL-17 e IL-23, que são responsáveis por ativar outros tipos celulares e induzir uma intensa resposta inflamatória (ANNUNZIATO et al., 2012). Talvez, o excesso de anticorpos gerados pela imunização com o grupo Lsa77+MPLA, seja o fator responsável pela promoção de uma resposta imune desequilibrada, diante de uma nova exposição ao antígeno.

Interessante que os resultados obtidos quanto à produção da citocina IL-10 corroboram com o que é relatado na literatura em função do uso de adjuvantes, visto que as formulações contendo Alum apresentaram concentrações maiores dessa citocina do que as formulações contendo MPLA (Figura 47 G), o que reforça a forte tendência dos adjuvantes a base de alumínio em direcionar uma resposta imune para o padrão *Th2* e a tendência de MPLA em promover uma resposta mais direcionada para o padrão *Th1*. No entanto, apesar dessa tendência ter sido notada, esse padrão não foi dominante, dada à presença de outras citocinas. De qualquer forma, estudos apontam a importância de IL-10 na prevenção da infecção causada por leptospiros (VOLZ et al., 2015).

Em relação aos fragmentos gerados a partir da LIC10537, como os dados de linfoproliferação não foram estatisticamente significativos, fica difícil fazer alguma associação com os dados obtidos referente à dosagem de citocinas. De qualquer forma, as citocinas IL-12, IFN- γ , IL-4 e IL-10 foram detectadas no sobrenadante das células dos animais imunizados com o fragmento 1 + Alum. O grupo de animais que receberam o fragmento 2 + MPLA, TNF- α , IL-12, IL-4 e IL-10 foram detectadas. Para ambos os grupos, a presença tanto de citocinas inflamatórias como anti-inflamatórias sugerem que um padrão misto de resposta tenha sido gerado, semelhante ao que foi observado para a proteína Lsa46. Coincidência ou não, esses grupos apresentaram um menor título de anticorpos. Nenhuma diferença significativa foi observada para os grupos que foram imunizados com o fragmento 2 da LIC10537 associado aos adjuvantes. Talvez, a não observação de dados significativos não se deve ao efeito da imunização, mas sim das condições de cultivo realizadas *in vitro*.

Os dados imunológicos obtidos até o momento foram considerados bastante interessantes, tendo em vista que as proteínas recombinantes foram imunogênicas, capazes de promover a proliferação celular e ativação de citocinas. Portanto, as formulações aqui testadas merecem ser avaliadas quanto à capacidade de promover proteção em hamster, após um desafio realizado com uma cepa virulenta de *L. interrogans*. Como camundongos BALB/c não são considerados bons modelos experimentais para o ensaio de desafio, pelo fato de não

promover sinais da doença, a próxima etapa do trabalho foi realizada com hamsters, que são considerados modelo padrão para ensaios de desafio (SILVA et al., 2008).

Figura 47 – Avaliação da secreção de citocinas no sobrenadante de esplenócitos estimulados *in vitro*. Camundongos BALB/c imunizados com as seguintes formulações vacinais: Lsa46+Alum, Lsa46+MPLA, Lsa77+Alum, Lsa77+MPLA, fragmento1+Alum, fragmento1+MPLA e fragmento2+Alum, fragmento2+MPLA ou imunizados com PBS+Alum, como controle (dados não mostrados), tiveram suas células do baço cultivadas em placa de cultura de 24 poços e estimuladas por 48h com meio (controle negativo) ou proteína (5 µg/mL). Após 48h o sobrenadante da cultura foi coletado e as citocinas IFN- γ (A e B), IL-12 (C e D), TNF- α (E e F), IL-10 (G e H) e IL-4 (I e J) foram dosadas por um Kit de ELISA. Os valores de absorbância obtidos foram comparados com os valores de uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de cada citocina e, por isso, os dados obtidos puderam ser expressos em pg/mL. As comparações para análise estatística foram feitas pelo teste t-Student entre o grupo de animais imunizados que receberam os seguintes estímulos *in vitro*: proteína e meio (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$) ou entre os grupos de animais imunizados com as proteínas e PBS, e posteriormente, estimulados *in vitro* com as respectivas proteínas (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$).

4.5.2 Avaliação imunoprotetora das formulações vacinais em hamsters

4.5.2.1 Perfil imunoprotetor da proteína Lsa46

Para avaliar o potencial protetor da proteína Lsa46, inicialmente realizamos um ensaio com diferentes adjuvantes. Assim, grupos de seis animais foram imunizados por via subcutânea, com duas doses das seguintes formulações vacinais: Lsa46+Alum, Lsa46+MPLA e Lsa46+DDA. Grupos controles foram imunizados com PBS+Alum e *bacterina*, que corresponde, respectivamente, ao controle negativo e positivo do experimento. Após duas semanas da última dose, os animais foram desafiados por via intraperitoneal, com uma dose letal de 1×10^4 *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona From, e acompanhados durante 21 dias para análise de sua sobrevivência. Uma vez que a *bacterina* utilizada nesse experimento foi produzida a partir da mesma linhagem utilizada no desafio, esse grupo deve apresentar 100 % de proteção.

Na Figura 48 A, é demonstrado o perfil de sobrevivência dos animais imunizados. Os resultados obtidos mostram que 67 % dos animais imunizados com Lsa46+Alum foram capazes de sobreviver após o desafio com as leptospiros, enquanto que a taxa de sobrevivência dos animais que receberam Lsa46+MPLA foi de 50 %. Já para o grupo de animais imunizados com Lsa46+DDA, apenas 17 % de sobrevivência foi notado. Embora, o adjuvante DDA também seja conhecido por ativar uma potente resposta imune humoral e celular, e sua eficácia vacinal já ter sido demonstrada, quando associado à proteína Lsa46, não foi capaz de gerar uma resposta imune apropriada para o controle da infecção (HILGERS; SNIPPE, 1992; KLINGUER-HAMOUR et al., 2002). O fato dos adjuvantes serem efetivos com um antígeno, mas não com outros, não é bem compreendido. Talvez, a atividade adjuvante de DDA se assemelhe com a atividade apresentada por outros adjuvantes como

MPLA e flagelina, onde a resposta imune obtida depende tanto do tipo de antígeno como da via de administração da vacina. Por esse motivo, cada caso deve ser analisado isoladamente. Além disso, outras estratégias podem ser aplicadas, visto que estudos na literatura demonstram que o uso combinado de adjuvantes pode ser benéfico, uma vez que a associação de DDA com MPLA foi capaz de ativar uma resposta imunoprotetora contra *Mycobacterium tuberculosis* (BRANDT et al., 2000). Apesar disso, a estratégia de combinar DDA com outros adjuvantes não foi aplicada nos nossos experimentos.

Figura 48 – Análise da sobrevivência dos animais imunizados e desafiados com uma cepa virulenta de *Leptospira*. Hamsters foram imunizados com 50µg da proteína Lsa46 associada a diferentes adjuvantes, por via subcutânea. Após 15 dias da última dose, os animais foram desafiados por via intraperitoneal com uma cepa virulenta de *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona From e acompanhados por 21 dias até a morte e/ou aparecimento dos sintomas típicos de leptospirose. Animais imunizados com *bacterina* e PBS foram utilizados para o controle de sobrevivência e morte, respectivamente. (A) Experimento 1, (B) Experimento 2, (C) Experimento 3 e (D) Experimento 4.

Assim, no segundo experimento realizado, apenas as formulações Lsa46+Alum e Lsa46+MPLA foram utilizadas. Nesse ensaio, escolhemos apenas esses dois adjuvantes, pelo fato de terem apresentado maior porcentagem de sobrevivência no experimento anterior. Com o objetivo de confirmar o potencial vacinal dessas formulações, grupos de 10 animais foram imunizados seguindo o mesmo protocolo de imunização descrito. Os resultados obtidos mostram que animais imunizados com Lsa46+MPLA apresentaram o mesmo perfil de sobrevivência obtido no primeiro experimento. Enquanto que, os animais imunizados com Lsa46+Alum apresentaram uma porcentagem de sobrevivência muito inferior ao que tinha sido encontrado (Figura 48 B). Esse fato não foi surpreendente, visto que problema relacionado à reprodutibilidade dos experimentos de desafio tem sido observado pelo nosso grupo. Atzingen e colaboradores (2012), quando avaliaram o potencial vacinal da proteína rLIC10672, nenhum nível de proteção foi obtido. No entanto, quando essa mesma proteína foi avaliada outra vez, foi constatado cerca de 40 % de proteção. Outro ponto importante observado nesse segundo experimento se refere aos dados obtidos para o grupo controle, já que, os animais imunizados com PBS+Alum apresentaram 20 % de sobrevivência. Todavia, o fato do grupo controle apresentar sobreviventes, é uma característica comumente observada por outros grupos. Tem sido relatado que, mesmo ensaios de desafio que foram realizados com altas doses de leptospiras (1×10^8) não foram suficientes para induzir a morte de todos os animais (CHANG et al., 2007; FAISAL et al., 2008; PALANIAPPAN et al., 2006). Possivelmente, essas discrepâncias observadas estão relacionadas com fatores intrínsecos tanto à virulência do patógeno como ao modelo animal utilizado. Além disso, as condições dos criadouros em que esses animais são mantidos não são conhecidas, o que nos leva a duvidar de uma possível pré-contaminação com leptopiras. Certamente, essas variações prejudicam na avaliação da efetividade apresentada pelo candidato vacinal.

Com o intuito de contornar as variações inerentes aos ensaios de desafio um terceiro experimento foi realizado. Uma das formas de tentar diminuir as variações obtidas em experimentação animal consiste em aumentar o número de animais por grupo. Levando em consideração o fato dos hamsters não serem animais isogênicos, essa questão é primordial na

tentativa de verificar algum efeito protetor. Assim, grupos de 20 animais foram imunizados seguindo o mesmo protocolo de imunização descrito. Dessa vez, a formulação vacinal escolhida para o teste foi Lsa46+MPLA, pelo fato de ter sido a formulação testada em que os dados foram reproduzidos no segundo experimento. Após análise dos resultados, o perfil de sobrevivência obtido foi de apenas 20 % (Figura 48 C). Os animais imunizados com PBS+MPLA apresentaram 10 % de sobrevivência. Novamente, problemas relacionados à falta de reprodutibilidade e ao grupo controle nos impediram de confirmar o potencial apresentado por esta formulação vacinal. Uma vez que, alguns animais imunizados apenas com PBS+Alum são capazes de sobreviver à infecção por leptospiros, sugere-se que estes animais apresentem algum mecanismo particular que acarreta na proteção da doença. Assim, quando os animais imunizados com formulações vacinais apresentam porcentagem elevada de sobrevivência, não é possível distinguir se essa sobrevivência é dada pelo processo de imunização ou por mecanismos do próprio hospedeiro. Uma estratégia utilizada na tentativa de associar algum nível de proteção obtido pelos candidatos vacinais é realizar a média das porcentagens de sobrevivência, obtida de 2 ou 3 ensaios de desafio (MONARIS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015). Assim, após realizar a média das porcentagens obtida nos 3 experimentos, notamos uma média de 40 % de proteção. Valores próximos a esses foram obtidas para outras proteínas de leptospiros, inclusive Lsa66 e Loa22, que são proteínas que contém o domínio *OmpA-like* (ATZINGEN et al., 2010; ATZINGEN et al., 2012; YAN et al., 2010).

O uso combinado de adjuvantes tem sido uma alternativa interessante na obtenção de respostas imune mais eficiente e, conseqüentemente, proteção da doença. O adjuvante ASO4, aprovado atualmente para uso em vacinas humanas, consiste da associação entre MPLA de *Salmonella* e hidróxido de alumínio (HARPER, 2009; THOELEN et al., 1998). Ao que tudo indica, o potencial adjuvante de ASO4 está associado à capacidade de ativar, de forma muito eficiente, células apresentadoras de antígeno. Parece que a ativação inicial da resposta imune é dada por MPLA, e o alumínio prolonga esse efeito no local da injeção (DIDIERLAURENT et al., 2009). O uso combinado do MPLA de *B. pertussis* também tem sido proposto para obtenção de uma resposta imune mais adequada para vacina inativada do influenza vírus (QUINTILIO et al., 2009). Assim, com o intuito de verificar se essa associação de adjuvantes é capaz gerar uma resposta imune eficiente para o controle da leptospirose, foi realizado outro ensaio de desafio. Os resultados obtidos mostram que 70 % dos animais imunizados com Lsa46+Alum+MPLA sobreviveram após o desafio com as leptospiros. Contudo, todos os

controles realizados também apresentaram porcentagens elevadas de sobrevivência (Figura 48D). A tabela 8 mostra o percentual de sobrevivência de todos os experimentos realizados.

Após os 21 dias de acompanhamento dos animais desafiados, aqueles que sobreviveram foram sacrificados e seus rins coletados para o isolamento de leptospiros. A tabela 8 mostra os resultados obtidos após o cultivo. Interessante notar que, embora os resultados obtidos não tenham sido reprodutíveis, quando observamos a presença de leptospiros nos rins dos animais sobreviventes notamos que aqueles animais que sobreviveram no grupo controle apresentaram culturas positivas, enquanto nos animais imunizados leptospiros não foi identificada. Em particular, os animais imunizados com o adjuvante MPLA apresentaram maior número de culturas negativas, sugerindo que esse adjuvante ativa um tipo de resposta imune que contribui para a remoção das leptospiros. Tem sido demonstrado para influenza vírus que, enquanto a presença de anticorpos IgG1 é importante para neutralização das partículas virais, IgG2a parece ser o responsável pela remoção do vírus (HUBER et al., 2006). Já para *Streptococcus pneumoniae*, foi observado que formulações vacinais que induziram apenas IgG1 contribuíram para a remoção da bactéria da mesma forma que as formulações que induziram as duas classes de anticorpos IgG1 e IgG2a (OMA et al., 2009).

Tabela 8 – Efeito da imunização das formulações vacinais contendo Lsa46

<i>Formulação vacinal</i>	<i>% de proteção (n° sobreviventes/total)</i>	<i>Cultura (negativo/total)</i>
<i>Experimento 1</i>		
PBS	0 (6/6)	-
Bacterina	100 (6/6)	6/6
Lsa46 + Alum	67 (4/6)	1/4
Lsa46 + MPLA	50 (3/6)	2/3
Lsa46 + DDA	17 (1/6)	0/6
<i>Experimento 2</i>		
PBS	20 (2/10)	0/2
Bacterina	100 (10/10)	10/10
Lsa46 + Alum	30 (3/10)	0/3
Lsa46 + MPLA	50 (5/10)	2/5
<i>Experimento 3</i>		
PBS	10 (2/20)	0/2
Bacterina	100 (20/20)	20/20
Lsa46 + MPLA	25 (5/20)	4/5
<i>Experimento 4</i>		
PBS+ Alum	60 (6/10)	-
PBS+ MPLA	40 (4/10)	-
PBS+Alum+MPLA	60 (6/10)	-
Bacterina	100 (10/10)	-
Lsa46+Alum+MPLA	70 (7/10)	-

Com o objetivo de avaliar o tipo de resposta imune gerada após as imunizações, os animais foram sangrados, duas semanas após cada dose, e os soros obtidos foram analisados quanto à produção de anticorpos específicos. Os resultados apresentados mostram que todas as formulações vacinais testadas foram capazes de induzir a formação de IgG (Figura 49). Os isotipos de IgG envolvidos nessa resposta imune também foram analisados, os resultados obtidos mostram que nenhum padrão único de resposta foi identificado, visto que todas as formulações vacinais testadas produziram quantidades semelhantes de IgG1/IgG2a, sugerindo assim, a presença de uma resposta equilibrada (*Th1/Th2*). Apesar das subclasses de IgG em hamsters serem pouco estudadas, dados na literatura mostram que a presença elevada de IgG2 está associado ao desenvolvimento de uma resposta imune celular efetiva para leishmaniose (BHOWMICK; RAVINDRAN; ALI, 2007; RODRIGUES JÚNIOR; DA SILVA; CAMPOS-NETO, 1992; SAMANT et al., 2009; SHIVAHARE et al., 2014). Recentemente, um aumento de IgG2/3 foi identificado em hamsters imunizados com uma proteína quimérica de *Leptospira* (FERNANDES et al., manuscrito em fase de elaboração).

De maneira geral, o padrão de resposta imune encontrado nos hamsters foi bastante similar ao que foi encontrado nos camundongos, indicando que realmente as formulações vacinais composta pela proteína Lsa46 induzem um padrão misto de resposta.

Figura 49 – Titulação de anticorpos produzidos após imunização com a proteína Lsa46. Os animais foram imunizados duas vezes, por via subcutânea com 50 µg da proteína Lsa46 associada a diferentes adjuvantes. Duas semanas após cada dose, os animais foram sangrados e os soros obtidos foram avaliados por ELISA contra a proteína recombinante correspondente, seguido do uso anti-IgG de hamster conjugado com peroxidase. Soro dos animais imunizados com *bacterina* e PBS utilizados como controle também foram analisados, porém quando a presença de anticorpo não foi detectada os dados não foram relatados no gráfico. (A) Experimento 1, (B) Experimento 2, (C) Experimento 3 e (D) Experimento 4.

B Experimento 2 **C** Experimento 3

4.5.2.2 Perfil imunoprotetor da proteína Lsa77

O potencial protetor da proteína Lsa77 foi avaliado seguindo o mesmo protocolo de imunização descrito para Lsa46. As formulações vacinais testadas foram: Lsa77+Alum e Lsa77+MPLA. Como os resultados com o adjuvante DDA não foram satisfatórios para a proteína Lsa46, ele não foi empregado nesse experimento. O grupo controle negativo foi imunizado com PBS+Alum, enquanto o grupo controle positivo recebeu *bacterina*. Após duas semanas da última dose, esses animais também foram desafiados por via intraperitoneal, com uma dose letal de 1×10^4 leptospiras, e acompanhados durante 21 dias para análise de sua sobrevivência. Os resultados obtidos mostram 50 % de proteção para o grupo de animais imunizados com Lsa77+Alum, ao passo que para o grupo Lsa77+MPLA apenas 10 % dos animais sobreviveram. No entanto, 20 % dos animais do grupo controle sobreviveram após o desafio (Figura 50 A). Talvez, um excesso de resposta inflamatória gerada, observado pelo alto título de anticorpos IgG2/3 e ausência de anticorpos IgG1 (Figura 51 A), tenha sido responsável pela falta de proteção notada. Embora, dados na literatura tem demonstrado a importância da resposta *Th1* na proteção da leptospirose em gados (BALDWIN et al., 2014; BALDWIN; TELFER, 2015; BLUMERMAN; HERZIG; BALDWIN, 2007; BLUMERMAN et al., 2007; NAIMAN et al., 2001). Faisal e colaboradores (2008) relatam que a proteção

obtida após imunização com uma vacina de DNA carregando o gene *LigA*, foi mediada pela ativação de uma resposta imune humoral e celular. Contudo, é importante ressaltar que o mesmo problema relatado no nosso trabalho com o grupo controle, foi observado no experimento destes autores. De qualquer modo, os dados apontam a importância na obtenção de uma resposta imune equilibrada.

Figura 50 – Análise da sobrevivência dos animais desafiados com uma cepa virulenta de *Leptospira*. Hamsters foram imunizados com 50 µg da proteína Lsa77 associada aos adjuvantes Alum, MPLA ou de forma combinada, por via subcutânea. Após 15 dias da última dose, os animais foram desafiados por via intraperitoneal com uma cepa virulenta de *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona From e acompanhados por 21 dias até a morte e/ou aparecimento dos sintomas típicos de leptospirose. Animais imunizados com *bacterina* e PBS foram utilizados para o controle de sobrevivência e morte, respectivamente. (A) Experimento 1, (B) Experimento 2 e (C) Experimento 3.

Com o objetivo de confirmar o potencial vacinal das formulações vacinais testadas anteriormente, realizamos um segundo experimento. Nesse ensaio um grupo de animal foi acrescentado para verificar o potencial de Lsa77 associada ao uso dos adjuvantes combinado. Assim, grupos de 10 animais foram imunizados seguindo o mesmo protocolo de imunização descrito. Os resultados obtidos mostram que animais imunizados com Lsa77+Alum apresentaram um perfil de sobrevivência de 60 %, semelhante ao que foi obtido no primeiro experimento. Essa mesma taxa de sobrevivência foi observada para o grupo de animais imunizados com os adjuvantes combinado. Enquanto que, os animais imunizados com Lsa77+MPLA que não tinham sido protegidos no primeiro experimento, apresentaram uma porcentagem de sobrevivência de 90 % (Figura 50 B). Contudo, os animais imunizados apenas com PBS e adjuvante apresentaram uma taxa de sobrevivência elevada. Interessante, que o perfil de resposta imune foi o mesmo do que observado no primeiro experimento (Figura 51 B).

Novamente, com o objetivo de demonstrar o potencial vacinal de Lsa77, uma nova tentativa foi realizada com as mesmas formulações vacinais que foram testadas no primeiro experimento. Os resultados obtidos para o grupo Lsa77+Alum foi bastante semelhante aos dois primeiros experimentos, com uma taxa de sobrevivência de 50 %. Já o perfil de sobrevivência obtido para os animais imunizados com Lsa77+MPLA foi de 100 % (Figura 50 C). No entanto, animais do grupo controle também foram capazes de sobreviver. Dados na literatura que apresentam 100 % de proteção tem sido demonstrado para as seguintes formulações: fragmentos de LigA+Alum, fragmentos de LigA+LigB+Freund's, fragmento de LigA+Freund's e fragmentos gênicos de LigA administrado em vacina de DNA. No entanto, problemas relacionados ao grupo controle têm sido observados em todos esses casos. Além disso, nenhuma dessas formulações foi capaz de conferir imunidade esterilizante (COUTINHO et al., 2011; FAISAL et al., 2008; KOIZUMI; WATANABE, 2004; PALANIAPPAN et al., 2006; SILVA et al., 2007). Quando a formulação vacinal composta pelas proteínas recombinantes OmpL1+LipL41 foi avaliada pela primeira vez, 100 % de sobrevivência foi observado. No entanto, ao realizar as repetições do experimento, os dados não foram reproduzidos (HAAKE et al., 1999). Assim como observado nos nossos experimentos, todas as formulações que conferiram 100 % de proteção apresentaram títulos elevados de anticorpos IgG. Em relação à isotipagem de IgG, o mesmo padrão foi observado, sugerindo que as formulações composta por Lsa77+Alum apresentam um tipo *Th1/Th2* de resposta, ao passo que Lsa77+MPLA, devido a presença de IgG2/3 e ausência de IgG1

apresentam uma resposta mais inflamatória (Figura 51 C). Por fim, a tabela 9 mostra os dados obtidos nos 3 experimentos de desafio.

Tabela 9 – Efeito da imunização das formulações vacinais contendo Lsa77

<i>Formulação vacinal</i>	<i>% de proteção (n° sobreviventes/total)</i>	<i>Cultura (negativo/total)</i>
<i>Experimento 1</i>		
PBS	20 (2/10)	0/2
Bacterina	100 (10/10)	10/10
Lsa77 + Alum	50 (5/10)	1/5
Lsa77 + MPLA	10 (1/10)	1/1
<i>Experimento 2</i>		
PBS+ Alum	60 (6/10)	-
PBS + MPLA	40 (4/10)	-
PBS+Alum+MPLA	60 (6/10)	-
Bacterina	100 (10/10)	-
Lsa77 + Alum	60 (6/10)	-
Lsa77 + MPLA	90 (9/10)	-
Lsa77+Alum+MPLA	60 (6/10)	-
<i>Experimento 3</i>		
PBS+ Alum	60 (5/8)	5/5
PBS+ MPLA	75 (6/8)	2/6
Bacterina	100 (6/6)	6/6
Lsa77 + Alum	50 (4/8)	4/4
Lsa77 + MPLA	100 (8/8)	6/8

Figura 51 – Titulação de anticorpos produzidos após imunização com a proteína Lsa77. Os animais foram imunizados duas vezes, por via subcutânea, com 50 µg da proteína Lsa77 associada aos adjuvantes Alum, MPLA ou em combinação. Duas semanas após cada dose, os animais foram sangrados e os soros obtidos foram avaliados por ELISA contra a proteína recombinante correspondente, seguido do uso anti-IgG de hamster conjugado com peroxidase. Soro dos animais imunizados com *bacterina* e PBS utilizados como controle também foram analisados, porém quando a presença de anticorpo não foi detectada os dados não foram relatados no gráfico. (A) Experimento 1, (B) Experimento 2 e (C) Experimento 3.

B Experimento 2

C Experimento 3

4.5.2.3 Perfil imunoprotetor dos fragmentos recombinantes gerados a partir da LIC10537

Para avaliar o potencial protetor dos fragmentos gerados a partir da LIC10537, um ensaio de desafio foi realizado com as seguintes formulações vacinais: fragmento 1 + Alum, fragmento 1 + MPLA, fragmento 2 + Alum e fragmento 2 + MPLA. Os grupos controles foram imunizados com PBS+Alum, PBS+MPLA (controle negativo) e *bacterina* (controle positivo). Grupos de 8 animais foram imunizados por via subcutânea, com duas doses da vacina, em intervalos de 15 dias. Após duas semanas da última dose, os animais foram desafiados por via intraperitoneal com leptospiros virulenta e acompanhados durante 21 dias para análise de sua sobrevivência. Os resultados obtidos para os animais imunizados com o

fragmento 1 da LIC10537 mostram uma sobrevivência de 60% para o grupo imunizado com o Alum e 50 % para os que receberam MPLA como adjuvante. Em relação ao fragmento 2 da LIC10537, 75 % e 60 % dos animais que receberam Alum e MPLA foram capazes de sobreviver ao desafio, respectivamente (Figura 52). Contudo, os animais imunizados com PBS também apresentaram essa capacidade de sobrevivência. Na tentativa de verificar se as formulações testadas induzem a formação de anticorpos, o soro destes animais imunizados foi analisado. Porém, não foi detectada a presença de anticorpos em nenhuma formulação testada. A tabela 10 mostra o perfil de sobrevivência obtido nesse ensaio de desafio e os resultados da cultura realizada dos rins dos animais sobreviventes.

Figura 52 – Análise da sobrevivência dos animais desafiados com uma cepa virulenta de *Leptospira*. Hamsters foram imunizados com 50 µg dos fragmentos 1 ou 2 da LIC10537 associados aos adjuvantes Alum e MPLA, por via subcutânea. Após 15 dias da última dose, os animais foram desafiados por via intraperitoneal com uma cepa virulenta de *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona From e acompanhados por 21 dias até a morte e/ou aparecimento dos sintomas típicos de leptospirose. Animais imunizados com *bacterina* e PBS foram utilizados para o controle de sobrevivência e morte, respectivamente.

Tabela 10 – Efeito da imunização das formulações vacinais contendo os fragmentos da LIC10537

<i>Formulação vacinal</i>	<i>% de proteção (n° sobreviventes/total)</i>	<i>Cultura (negativo/total)</i>
<i>Experimento 1</i>		
PBS+ Alum	60 (5/8)	5/5
PBS+ MPLA	75 (6/8)	2/6
Bacterina	100 (6/6)	6/6
Fragmento 1 + Alum	60 (5/8)	4/5
Fragmento 1 + MPLA	50 (4/8)	3/4
Fragmento 2 + Alum	75 (6/8)	3/6
Fragmento 2 + MPLA	60 (5/8)	5/5

De modo geral, os dados obtidos sugerem que as proteínas Lsa46 e Lsa77 estimularam uma resposta imune que foi capaz de conferir certo grau de proteção. No entanto, as mesmas dificuldades relacionadas ao modelo animal, que comumente é descrito por outros grupos, foram presenciadas nos nossos experimentos, o que dificulta avaliar o real potencial vacinal desses candidatos. Porém, os nossos dados apontam que o uso do adjuvante MPLA associado às proteínas recombinantes foi capaz de promover uma modulação de resposta imune que conferiu uma remoção maior das leptospiras nos rins dos animais infectados, quando comparado a outros grupos. Embora não tenha sido capaz de promover a esterilidade, essa característica é interessante e merece ser avaliada cuidadosamente, visto que até o momento não existe formulação vacinal à base de proteínas recombinantes capaz de remover as leptospiras dos órgãos de animais infectados.

Os dados obtidos no presente trabalho nos permitem apontar as seguintes conclusões:

- Análise *in silico* de conservação entre as sequências de aminoácidos dos genes selecionados com outras espécies e sorovares de leptospiros mostra que esses genes são conservados. Análise de RT-qPCR revela que os três genes são expressos nas cepas de leptospiros, a expressão relativa maior observada na cepa virulenta em relação à cepa atenuada indica que essas proteínas podem estar envolvidas no processo de infecção.
- Os genes LIC13479 e LIC10050 foram clonados com sucesso. Problemas relacionados à clonagem do gene LIC10537 nos conduziu a uma nova estratégia de clonagem, com resultados positivos. Todos os genes foram expressos em cepas de *E. coli*. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade, embora algumas alíquotas tenham precipitado após o processo de diálise das proteínas, podemos concluir que houve sucesso nessa etapa. As proteínas recombinantes foram reconhecidas por anticorpos específicos. Análise de CD mostrou que as proteínas recombinantes apresentam estrutura secundária.
- Estudos de localização apontam que as proteínas estão expostas na superfície da bactéria, o que corrobora com os dados obtidos *in silico*. As proteínas recombinantes foram capazes de ser reconhecidas por anticorpos presente no soro de indivíduos com leptospirose, sugerindo que sejam expressas durante a infecção.
- O fato das proteínas Lsa46 e Lsa77 terem sido bastante reativas com amostras de soros correspondentes à fase inicial da leptospirose revela o potencial dessas proteínas como marcador para uso em diagnóstico.
- As proteínas recombinantes LIC13479 e LIC10050 foram capazes de interagir com laminina e por isso foram nomeadas como adesinas Lsa46 e Lsa77, respectivamente. Ambas as proteínas foram capazes de se ligar ao PLG e fibronectina plasmática de maneira dose-dependente. Em relação aos fragmentos gerados a partir da LIC10537, apenas o fragmento 2 apresentou capacidade de ligação ao PLG. Todas as proteínas recombinantes, quando avaliadas quanto à capacidade de converter PLG à sua forma ativa, foram capazes de realizar tal função, indicando que essas proteínas podem auxiliar as leptospiros a aumentar sua capacidade proteolítica e assim contribuir para os processos de invasão e evasão no hospedeiro.

- Todas as proteínas recombinantes foram capazes de ativar uma resposta imunológica específica quando empregadas em diferentes formulações vacinais. O perfil de resposta imune gerado pela Lsa46 e fragmentos da LIC10537 foi associado a um padrão misto de resposta. A formulação vacinal composta pela proteína Lsa77 associada a MPLA apresentou uma tendência de resposta com perfil mais inflamatório. As proteínas recombinantes quando avaliadas em ensaio de desafio foram capazes de promover uma proteção parcial.

Conclusão final

- As proteínas do presente estudo, por estarem expostas na superfície e participarem na interação com diferentes moléculas do hospedeiro, podem contribuir para os mecanismos de patogenicidade das leptospiros. Lsa46 e Lsa77 apresentam potencial elevado para uso como marcador de diagnóstico de fase inicial da doença, por esse motivo, merecem ser ensaiadas com uma amostragem maior de soros. Lsa46 e Lsa77 podem ser investigadas como candidatos vacinais, uma vez que são capazes de ativar uma resposta imune específica. No entanto, outras estratégias devem ser empregadas para melhorar a proteção obtida por essas formulações e também para minimizar os problemas obtidos com o modelo animal utilizado.

REFERÊNCIAS*

*De acordo com:

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

- ADINDLA, S. et al. Identification and analysis of novel tandem repeats in the cell surface proteins of archaeal and bacterial genomes using computational tools. **Comp. Funct. Genomics.**, v. 5, n. 1, p. 2-16, 2004
- 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.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. The Extracellular Matrix of Animals. **Garland Science**, New York, NY, 2007.
- ALTERI, C. J. et al. Mucosal immunization with iron receptor antigens protects against urinary tract infection. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 9, p. e1000586, 2009.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- _____. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANNUNZIATO, F. et al. Defining the human T helper 17 cell phenotype. **Trends. Immunol.**, v. 33, n. 10, p. 505-512, 2012.
- ATZINGEN, M. V. et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol.**, v. 8, p. 70, 2008.
- _____. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. **J. Infect.**, v. 59, n. 4, p. 264-276, 2009.
- _____. Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with Leptospira interrogans. **J. Med. Microbiol.**, v. 59, pt. 9, p. 1005-1015, 2010.
- _____. Evaluation of immunoprotective activity of six leptospiral proteins in the hamster model of leptospirosis. **Open Microbiol. J.**, v. 6, p. 79-87, 2012.
- BALDWIN, C. L. et al. The role of bovine $\gamma\delta$ T cells and their WC1 co-receptor in response to bacterial pathogens and promoting vaccine efficacy: a model for cattle and humans. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 159, n. 3-4, p. 144-155, 2014.
- BALDWIN, C. L.; TELFER, J. C. The bovine model for elucidating the role of $\gamma\delta$ T cells in controlling infectious diseases of importance to cattle and humans. **Mol. Immunol.**, v. 66, n. 1, p. 35-47, 2015.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 10, n. 5, p. 411-421, 1999.

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

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

BERGMANN, S.; HAMMERSCHMIDT, S. Fibrinolysis and host response in bacterial infections. **Thromb. Haemost.**, v. 98, n. 3, p. 512-520, 2007.

BERGMANN, S.; SCHOENEN, H.; HAMMERSCHMIDT, S. The interaction between bacterial enolase and plasminogen promotes adherence of *Streptococcus pneumoniae* to epithelial and endothelial cells. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 303, n. 8, p. 452-462, 2013.

BETTS, J. C. Transcriptomics and proteomics: tools for the identification of novel drug targets and vaccine candidates for tuberculosis. **IUBMB Life.**, v. 53, n. 4-5, p. 239-242, 2002.

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

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

BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. Leishmanial antigens in liposomes promote protective immunity and provide immunotherapy against visceral leishmaniasis via polarized Th1 response. **Vaccine**, v. 25, n. 35, p. 6544-6556, 2007.

BLUMERMAN, S. L.; HERZIG, C. T.; BALDWIN, C. L. WC1+ gammadelta T cell memory population is induced by killed bacterial vaccine. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, n. 5, p. 1204-1216, 2007.

BLUMERMAN, S. L. et al. Comparison of gene expression by co-cultured WC1+ gammadelta and CD4+ alphabeta T cells exhibiting a recall response to bacterial antigen. **Mol. Immunol.**, v. 44, n. 8, p. 2023-2035, 2007.

BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis on type hardjo-bovis infection of cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v. 50, n. 12, p. 2004-2008, 1989.

BOURHY, P. et al. Comparison of Real-Time PCR Assays for Detection of Pathogenic *Leptospiraspp.* in Blood and Identification of Variations in Target Sequences. **J. of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2154-2160, 2011

BRANDT, L. et al. ESAT-6 subunit vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun.**, v. 68, n. 2, p. 791-795, 2000.

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

BULACH, D. M. et al. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 2, n. 4, p. 375-380, 2000.

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

BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.

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

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

CASELLA, C. R.; MITCHELL, T. C. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 65, n. 20, p. 3231-3240, 2008.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M. et al. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **J. Infect. Dis.**, v. 205, n. 6, p. 995-1004, 2012.

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

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

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

CHIRATHAWORN, C.; KONGPAN, S. Immune responses to *Leptospira* infection: roles as biomarkers for disease severity. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 18, n. 1, p. 77-81, 2014.

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

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.

COLEMAN, J. L. et al. *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. **Infect Immun.**, v. 63, n. 7, p. 2478-2484, 1995.

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

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

CROCQUET-VALDES, P. A. et al. Immunization with a portion of rickettsial outer membrane protein A stimulates protective immunity against spotted fever rickettsiosis. **Vaccine**, v. 20, n. 5-6, p. 979-988, 2001.

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

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

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

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

CULLEN, P. A. et al. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infect Immun.**, v. 71, n. 5, p. 2414-2421, 2003.

DA SILVA, L. B. et al. Pathogenic *Leptospira* species acquire factor H and vitronectin via the surface protein LcpA. **Infect Immun.**, v. 83, n. 3, p. 888-897, 2015.

DAVANLOO, P. et al. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 81, n. 7, p. 2035-2039, 1984.

DE FOST, M. et al. Interleukin 12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with *Leptospira interrogans*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, n. 2, p. 332-335, 2003.

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

DIDIERLAURENT, A. M. et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. **J. Immunol.**, v. 183, n. 10, p. 6186-6197, 2009.

DOMINGOS, R. et al. The novel *Leptospira interrogans* protein Lsa32 is expressed during infection and binds laminin and plasminogen. **Microbiology**, 2015.

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

ELLINGHAUSEN, H. C., JR.; MCCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira Pomona* and Growth of 13 Other Serotypes: a Serum-Free Medium Employing Oleic Albumin Complex. **Am. J. Vet. Res.**, v. 26, p. 39-44, 1965.

ETZ, H. et al. Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 99, n. 10, p. 6573-6578, 2002.

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

EVANGELISTA, K. V. et al. Identification of cell-binding adhesins of *Leptospira interrogans*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 10, p. e3215, 2014.

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

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

_____. *Leptospira* immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. **Vaccine**, v. 27, n. 3, p. 378-387, 2009.

FELDMAN, C.; ANDERSON, R. Review: current and new generation pneumococcal vaccines. **J. Infect.**, v. 69, n. 4, p. 309-325, 2014.

FENNO, J. C. et al. Identification of a *Treponema denticola* OppA homologue that binds host proteins present in the subgingival environment. **Infect Immun.**, v. 68, n. 4, p. 1884-1892, 2000.

FERNANDES, L. G. et al. *Leptospira* spp.: Novel insights into host-pathogen interactions. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 2015.

_____. Functional and immunological evaluation of two novel proteins of *Leptospira* spp. **Microbiology**, v. 160, p. 149-164, 2014.

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

FRAGA, T. R. et al. Refolding of the recombinant protein OmpA70 from *Leptospira interrogans* from inclusion bodies using high hydrostatic pressure and partial characterization of its immunological properties. **J. Biotechnol.**, v. 148, n. 2-3, p. 156-162, 2010.

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

GAMBERINI, M. et al. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 244, n. 2, p. 305-313, 2005.

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

GOUVEIA, E. L. et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, n. 3, p. 505-508, 2008.

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

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nat. Protoc.**, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006.

GUERRA, M. A. Leptospirosis: public health perspectives. **Biologicals**, v. 41, n. 5, p. 295-297, 2013.

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. et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 13, p. 4225-4234, 1993.

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

_____. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. **Infect Immun.**, v. 66, n. 4, p. 1579-1587, 1998.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Mol. Microbiol.**, v. 77, n. 4, p. 805-814, 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.

_____. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. **Infect Immun.**, v. 59, n. 3, p. 1131-1140, 1991.

HAAKE, D. A.; ZÜCKERT, W. R. The leptospiral outer membrane. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 387, p. 187-221, 2015.

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

HARPER, D. M. Currently approved prophylactic HPV vaccines. **Expert Rev. Vaccines**, v. 8, n. 12, p. 1663-1679, 2009.

HARTWIG, D. D. et al. Characterization of the immunogenic and antigenic potential of putative lipoproteins from *Leptospira interrogans*. **Curr. Microbiol.**, v. 62, n. 4, p. 1337-1341, 2011.

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

HILGERS, L. A.; SNIPPE, H. DDA as an immunological adjuvant. **Res. Immunol.**, v. 143, n. 5, p. 494-503; discussion 574-496, 1992.

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.

HUBER, V. C. et al. Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 13, n. 9, p. 981-990, 2006.

JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. **J. Bacteriol.**, v. 94, n. 1, p. 27-31, 1967.

JOHNSON, R. C.; ROGERS, P. Metabolism of leptospires. II. The action of 8-azaguanine. **Can. J. Microbiol.**, v. 13, n. 12, p. 1621-1629, 1967.

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

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

KLINGUER-HAMOUR, C. et al. DDA adjuvant induces a mixed Th1/Th2 immune response when associated with BBG2Na, a respiratory syncytial virus potential vaccine. **Vaccine**, v. 20, n. 21-22, p. 2743-2751, 2002.

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

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

KUUSELA, P.; SAKSELA, O. Binding and activation of plasminogen at the surface of *Staphylococcus aureus*. Increase in affinity after conversion to the Lys form of the ligand. **Eur. J. Biochem.**, v. 193, n. 3, p. 759-765, 1990.

KYRIAKIDIS, I.; SAMARA, P.; PAPA, A. Serum TNF- α , sTNFR1, IL-6, IL-8 and IL-10 levels in Weil's syndrome. **Cytokine**, v. 54, n. 2, p. 117-120, 2011.

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

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.

LIJNEN, H. R. Elements of the fibrinolytic system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 936, p. 226-236, 2001.

LIN, Y. P. et al. A novel fibronectin type III module binding motif identified on C-terminus of *Leptospira* immunoglobulin-like protein, LigB. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 389, n. 1, p. 57-62, 2009.

LO, M. et al. Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. **Infect Immun.**, v. 74, n. 10, p. 5848-5859, 2006.

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

LOPEZ, P. J. et al. The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. **Mol. Microbiol.**, v. 33, n. 1, p. 188-199, 1999.

LOTTENBERG, R. et al. Streptokinase-producing streptococci grown in human plasma acquire unregulated cell-associated plasmin activity. **J. Infect. Dis.**, v. 166, n. 2, p. 436-440, 1992.

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

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.

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

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

_____. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. **Infect Immun.**, v. 73, n. 1, p. 70-78, 2005.

_____. LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. **Microbiology**, v. 152, n. Pt 12, p. 3777-3786, 2006.

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

MIDWINTER, A. et al. Characterization of an antigenic oligosaccharide from *Leptospira* interrogans serovar pomona and its role in immunity. **Infect Immun.**, v. 62, n. 12, p. 5477-5482, 1994.

MILES, L. A. et al. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. **Biochemistry**, v. 30, n. 6, p. 1682-1691, 1991.

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

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

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

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

NAIMAN, B. M. et al. 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.; 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.

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

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, 2004.

OLDFIELD, N. J. et al. Identification and characterization of novel antigenic vaccine candidates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Vaccine**, v. 26, n. 16, p. 1942-1954, 2008.

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.

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

_____. 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. L. et al. Evaluation of the *Leptospira interrogans* Outer Membrane Protein OmpL37 as a Vaccine Candidate. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0142821, 2015.

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

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

OMA, K. et al. Intranasal immunization with a mixture of PspA and a Toll-like receptor agonist induces specific antibodies and enhances bacterial clearance in the airways of mice. **Vaccine**, v. 27, n. 24, p. 3181-3188, 2009.

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.

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

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

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

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

_____. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e51025, 2013.

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.

PRASADARAO, N. V. et al. A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein mediates serum resistance of *Escherichia coli* K1. **J. Immunol.**, v. 169, n. 11, p. 6352-6360, 2002.

_____. Cloning and expression of the *Escherichia coli* K1 outer membrane protein A receptor, a gp96 homologue. **Infect Immun.**, v. 71, n. 4, p. 1680-1688, 2003.

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

QUINTILIO, W. et al. Bordetella pertussis monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. **Vaccine**, v. 27, n. 31, p. 4219-4224, 2009.

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.

RAW, I. et al. Method to obtain monophosphoryl lipid A from *Brordetella pertussis* a by-product of the cellular vaccine production. 2006. (PCTBR2007/000073).

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

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

RICALDI, J. N. et al. Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 10, p. e 1853, 2012.

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

RODRIGUES JÚNIOR, V.; DA SILVA, J. S.; CAMPOS-NETO, A. Selective inability of spleen antigen presenting cells from *Leishmania donovani* infected hamsters to mediate specific T cell proliferation to parasite antigens. **Parasite Immunol.**, v. 14, n. 1, p. 49-58, 1992.

SAMANT, M. et al. Immunization with the DNA-encoding N-terminal domain of proteophosphoglycan of *Leishmania donovani* generates Th1-type immunoprotective response against experimental visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 183, n. 1, p. 470-479, 2009.

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

SCHEIN, C. H. Optimizing protein folding to the native state in bacteria. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 2, n. 5, p. 746-750, 1991.

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.

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

SHANG, E. S.; SUMMERS, T. A.; HAAKE, D. A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infect Immun.**, v. 64, n. 6, p. 2322-2330, 1996.

SHIVAHARE, R. et al. Combination of liposomal CpG oligodeoxynucleotide 2006 and miltefosine induces strong cell-mediated immunity during experimental visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94596, 2014.

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

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

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 99, n. 4, p. 303-310, 2005.

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

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

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

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

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

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Protein secondary structure from circular dichroism spectroscopy. Combining variable selection principle and cluster analysis with neural network, ridge regression and self-consistent methods. **J. Mol. Biol.**, v. 242, n. 4, p. 497-507, 1994.

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.

STIRNIMANN, C. U. et al. WD40 proteins propel cellular networks. **Trends Biochem. Sci.**, v. 35, n. 10, p. 565-574, 2010.

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

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

SVS - Reunión Internacional de países que están enfrentando brotes de leptospirosis en las Americas. Pais: Brazil. Managua,Nicaragua - agosto de 2012.

THOELEN, S. et al. Safety and immunogenicity of a hepatitis B vaccine formulated with a novel adjuvant system. **Vaccine**, v. 16, n. 7, p. 708-714, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. Interaction of spirochetes with the host fibrinolytic system and potential roles in pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 27, p. 1-15, 2015.

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

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **J. Biosci.**, v. 33, n. 4, p. 557-569, 2008.

VOLZ, M. S. et al. Specific CD4+ T-Cell Reactivity and Cytokine Release in Different Clinical Presentations of Leptospirosis. **Clin. Vaccine. Immunol.**, v. 22, n. 12, p. 1276-1284, 2015.

WAGENAAR, J. F. et al. Soluble ST2 levels are associated with bleeding in patients with severe Leptospirosis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, n. 6, p. e453, 2009.

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

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

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.

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

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

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

YAN, Y. et al. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to leptospira. **J. Chin. Med. Assoc.**, v. 66, n. 4, p. 224-230, 2003.

YANAGIHARA, Y. et al. Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 30, n. 5-6, p. 399-413, 2007.

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

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

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

ZUERNER, R. L. et al. Characterization of outer membrane and secreted proteins of *Leptospira interrogans* serovar pomona. **Microb. Pathog.**, v. 10, n. 4, p. 311-322, 1991.

Súmula curricular

1. Formação

Doutoramento

Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia

Centro de Biotecnologia

Instituto Butantan.

(Fevereiro/2012- até a presente data)

Mestrado

Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Instituto de Ciências Biomédicas II

Universidade de São Paulo

(Julho/2009-Setembro/2011)

Graduação

Ciências Biológicas – Bacharelado e Licenciatura

Universidade do Grande ABC

(Fevereiro/2004-Dezembro/2007)

2. Produção Científica obtida no Doutorado

Artigos publicados

Siqueira GH, **Teixeira** AF, Fernandes LG, de Souza GO, Kirchgatter K, Romero EC, Vasconcellos SA, Vieira ML, Nascimento AL. The recombinant LIC10508 is a plasma fibronectin, plasminogen, fibrinogen and C4BP-binding protein of *Leptospira interrogans*. **Pathog Dis.** 2016.

Fernandes LG, Siqueira GH, **Teixeira** AR, Silva LP, Figueredo JM, Cosate MR, Vieira , Nascimento AL. *Leptospira* spp.: Novel insights into host-pathogen interactions. **Vet Immunol Immunopathol.** 2015.

Teixeira AF, de Moraes ZM, Kirchgatter K, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL. Features of two new proteins with OmpA-like domains identified in the genome sequences of *Leptospira interrogans*. **PLoS One**. 2015.

ML, Fernandes LG, Domingos RF, Oliveira R, Siqueira GH, Souza NM, **Teixeira** AR, Atzingen MV, Nascimento AL. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. **FEMS Microbiol Lett**. 2014.

Artigos em preparação

Fernandes LG, **Teixeira** AF, de Souza GO, Kirchgatter K, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL. Characterization of immune response and protective profile elicited by a novel multi-epitope chimeric protein from *Leptospira*.

Teixeira AF, Fernandes LG, de Souza GO, Vasconcellos SA, Nascimento AL. Evaluation of the *Leptospira interrogans* Lsa46 and Lsa77OmpA-like proteins as a vaccine candidate.

Teixeira AF, Kirchgatter K, Romero EC, Nascimento AL. Characterization of the immunogenic and functional properties of a outer membrane protein from *Leptospira interrogans*

Capítulo de livro

Mapeamento de genomas bacterianos: sequenciamento e funcional de *Leptospira*. Renan F. Domingos, Gabriela H. Siqueira, Luis G. Fernandes, **Aline R. F. Teixeira**, Lucas P. Silva, Maria R. Cosate, Monica L. Vieira, Ana L. T. O. Nascimento, em “Biotecnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e Aplicações”, Rodrigo Resende e Carlos Ricardo Soccol, eds., 2015

3. Patentes

Pedido de patente da invenção intitulada “ Processo de obtenção da sequência LIC13479 derivada do genoma de *Leptospira interrogans* o seu uso como candidato vacinal e/ou diagnóstico para leptospirose.” O pedido realizado ao Núcleo de Inovação Tecnológica do Instituto Butantan – NIT IB está em processo de análise (2015).

4. Participações em Congressos

Comunicações em congressos: 1 nacional e 3 internacionais

5. Estágios

Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – PAE, 1º semestre de 2015, junto a disciplina BMM271 – Microbiologia Básica, ministrada pelo Departamento de Microbiologia, curso Medicina. Supervisão: Prof. Dr Edison Luiz Durigon.