Brenda Daroz

Avaliação do papel funcional de proteínas da família HtrA de *Leptospira interrogans*

São Paulo

2021

Brenda Daroz

Avaliação do papel funcional de proteínas da família HtrA de *Leptospira interrogans*

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento

Co-orientador: Dr. Luis Guilherme Virgílio Fernandes

Versão original.

São Paulo

2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Daroz, Brenda
Avaliação do papel funcional de proteínas da família HtrA de Leptospira interrogans / Brenda Daroz; orientadora Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento; coorientador Luis Guilherme Virgílio Fernandes. -- São Paulo, 2021.
160 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Leptospira. 2. Leptospirose. 3. HtrA. 4. Patogênese. I. Tabet Oller do Nascimento, Ana Lúcia , orientador. II. Virgílio Fernandes, Luis Guilherme, coorientador. III. Título.

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

Candidato(a): Brenda Daroz

Título da Tese: Avaliação do papel funcional de proteínas da família HtrA de *Leptospira interrogans*

Orientador: Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento .

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

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

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

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

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

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

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

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

butantan

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Obtenção de mutantes de Leptospira biflexa e Leptospira interrogans para a avaliação do papel funcional de proteínas do tipo HtrA presentes nas estirpes patogênicas", protocolada sob o CEUA nº 6736110219 (ID 001556), sob a responsabilidade de **Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento** *e equipe; Brenda Daroz; Luis Guilherme Fernandes* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 20/02/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of the functional role of HtrA-like proteins present in pathogenic strains by creating mutants of Leptospira biflexa and Leptospira interrogans", utilizing 40 Isogenics mice (40 females), protocol number CEUA 6736110219 (ID 001556), under the responsibility of **Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento** *and team; Brenda Daroz; Luis Guilherme Fernandes* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 02/20/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 03/2019 a 02/2021 Área: Biotecnologia

Origem:	Biotério Central						
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas	idade:	30 a 45 dias	N:	40
Linhagem:	Balb/c			Peso:	18 a 22 g		

Local do experimento: Infectorio Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vaci

São Paulo, 21 de fevereiro de 2019

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

butantan

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 10 de novembro de 2021
CEUA N 6736110219
(ID 004952)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Ana Lucia Tabet Oller Do Nascimento
Área: Biotecnologia

Título da proposta: "Avaliação do papel funcional de proteínas da família HtrA de Leptospira interrogans".

CERTIFICADO (Alteração do cadastro versão de 21/outubro/2021)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 21/outubro/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O título da tese de doutorado foi alterado devido a mudança de resultados e aprovada pela CPG do Programa Interunidades em Biotecnologia IBu/IPT/USP. Para anexar o certificado da CEUA na Tese de Doutorado precisamos de uma alteração do título para: "Avaliação do papel funcional de proteínas da família HtrA de Leptospira interrogans" Solicito portanto uma alteração do certificado. Estou anexando a aprovação da CPG.".

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Animais Instituto Butantan

Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de
Instituto Butantan

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

Decl. CEP. 10.2021

DECLARAÇÃO

Em adendo ao **Certificado de Isenção CEP nº 870/2017**, aprovado em 12/09/2017, e por solicitação da orientadora, **Profa.Dra. Ana Lucia Tabet O. Nascimento** do **Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas - Instituto Butantan** e do Programa de Pós-Graduação do Programa Interunidades em Biotecnologia, informamos que o título do projeto da aluna: **Brenda Daroz** foi alterado para: **"Avaliação do papel funcional de proteínas da família HtrA de *Leptospira interrogans*",** visto a melhor adequação do título ao estudo desenvolvido.

São Paulo, 20 de outubro de 2021.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

Dedico este trabalho a mim mesma, por enfrentar todos os obstáculos encontrados para chegar até aqui.

À minha mãe, meu irmão e meu namorado por sempre me apoiarem na minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento pela oportunidade oferecida de poder trabalhar num laboratório de excelência, onde pude crescer e amadurecer profissionalmente, por toda a orientação oferecida e pelo conhecimento transmitido.

Ao meu co-orientador Luis Guilherme, por aguentar todas as lamentações durante esse tempo em que os resultados obtidos nem sempre eram os esperados. Por todas as inspirações, orientações, discussões que foram grandemente incorporados ao meu conhecimento. Será para sempre uma inspiração diária.

Aos meus colegas de laboratório Maria Fernanda, Aline, Maria Beatriz, Felipe, Leandro, Roberta que me receberam tão bem e me ensinaram tanto, deixando o ambiente de trabalho sempre divertido.

Às minhas amigas da vida Paula, Glaucia, Fabi e Camila que, mesmo longe, sempre estiveram presentes para podermos desabafar umas com as outras. Sou eternamente grata por tê-las conhecido.

Ao meu namorado Fuad, que sempre esteve comigo durante todos os momentos de alegria e tristeza, por sempre me apoiar e me ouvir.

A minha mãe Eliana e meu irmão Bruno por serem meu suporte familiar e estarem sempre dispostos a me ouvir e aconselhar.

Aos meus três filhos felinos Luna, Cosmo e Olívia, que, com certeza, me ajudaram demais nessa trajetória.

Aos membros do Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, Dr. Silvio Vasconcellos, Dr. Marcos Heinemann e Gisele Souza pela colaboração e fornecimento das culturas de leptospiras.

Ao Dr. Enéas Carvalho pelos ensaios de dicroísmo celular.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, as secretarias que sempre me ajudaram com questões burocráticas e aos professores que tive durante meu doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Fundação Buntantan.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos nos primeiros meses do meu projeto.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Doutorado Direto (Processo 2018/21959-8) e financiamento do projeto de pesquisa.

Muito obrigada!

"O conhecimento nos faz responsáveis."

Che Guevara

RESUMO

DAROZ, Brenda. **Avaliação do papel funcional de proteínas da família HtrA de *Leptospira interrogans*.** 2021. 160 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A leptospirose é uma zoonose de importância global recentemente incluída na lista das Doenças Tropicais Negligenciadas, causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Os roedores desempenham o papel de principais reservatórios da doença em centros urbanos por permitirem a colonização das leptospiras nos túbulos renais proximais e as excretarem vivas na urina. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o número de casos clínicos anuais no mundo permanece subestimado, principalmente por causa do amplo espectro de sintomas inespecíficos que o paciente pode apresentar além de um ineficiente diagnóstico, sobretudo na fase inicial da doença. Não há vacina eficaz até o momento. A identificação de proteínas da membrana externa conservadas entre estirpes patogênicas é o principal alvo de pesquisa para elucidar os mecanismos de patogenicidade. São estas proteínas que, provavelmente, estão envolvidas na interação das leptospiras com o ambiente externo, podendo também servir de alvo para o sistema imune do hospedeiro. Algumas espiroquetas se utilizam de proteases de membrana externa como um mecanismo de disseminação por tecidos do hospedeiro. Neste sentido, o projeto propõe a clonagem e expressão de três proteínas preditas como sendo do tipo HtrA (do inglês *High Temperature Requirement* A), uma importante família de proteases, identificadas por bioinformática no genoma de *L. interrogans*. Os genes que codificam estas proteínas, LIC11111, LIC11112 e LIC20143, foram amplificados a partir do DNA genômico e o inserto clonado em vetor de expressão em *Escherichia coli;* então as proteínas foram purificadas e utilizadas para realização dos experimentos. Foram avaliados (a) atividade de imunogenicidade das proteínas em modelo animal, (b) reatividade das proteínas recombinantes frente a soros de pacientes diagnosticados com leptospirose, (c) interação dessas proteínas com macromoléculas do hospedeiro (d) conservação frente a diferentes estirpes de *Leptospira* e (e) atividade enzimática das proteínas. Construções da LIC11111, LIC11112 e LIC20143 fusionadas com os promotores fortes e constitutivos dos genes *lipL32* e *lipL21* de *L. interrogans* foram feitas para transformar *L. biflexa* sorovar Patoc e avaliar o possível ganho de função na bactéria saprofítica.

Palavras-chave: *Leptospira*, leptospirose, HtrA, patogênese.

ABSTRACT

DAROZ, Brenda. **Functional role evaluation of proteins from the HtrA family of *Leptospira interrogans*.** 2021. 160 f. Thesis (PhD in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Leptospirosis is a zoonosis of global importance includ*ed* in the list of Neglected Tropical Diseases, caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*. Rodents are the main reservoir of the disease in urban centers by allowing colonization of leptospires in the proximal renal tubules and excreting them alive in urine. According to the World Health Organization, the number of annual clinical cases in the world remains underestimated, mainly because of the wide spectrum of nonspecific symptoms that the patient can present, in addition to an inefficient diagnosis, especially in the initial phase of the disease. To date, there is no effective vaccine. The identification of outer membrane proteins conserved among pathogenic strains is the main research goal to elucidate the mechanisms of pathogenicity. These proteins are probably involved in the interaction of leptospires with the external environment and may also serve as a target for the host's immune system. Some spirochetes use outer membrane proteases as a mechanism for spreading through host tissues. In this sense, the project proposes the cloning and expression of three proteins predicted to be of the HtrA family (High Temperature Requirement A), an important family of proteases, identified by bioinformatics in the genome sequences of *L. interrogans*. The genes encoding these proteins, LIC11111, LIC11112 and LIC20143, were amplified from genomic DNA and the insert were cloned into pAE expression vector in *Escherichia coli*; then the proteins were purified and used for the experiments. We evaluated (a) immunogenicity activity of proteins in an animal model, (b) reactivity of recombinant proteins against sera from patients diagnosed with leptospirosis, (c) interaction of these proteins with host macromolecules (d) conservation against different strains of *Leptospira* and (e) enzymatic activity of proteins. Constructs from LIC11111, LIC11112 and LIC20143 fused with the strong and constitutive promoters of the *L. interrogans* genes *lipL32* and *lipL21* were obtained and used to transform *L. biflexa* serovar Patoc and evaluate the possible gain of function in the saprophytic bacteria.

Keywords: *Leptospira*, leptospirosis, HtrA, pathogenesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia da *Leptospira* spp. 24

Figura 2 - Modelo da arquitetura da membrana de *Leptospira* spp. 25

Figura 3 - Árvore filogenética baseado nas sequências de identidade média de nucleotídeos (ANI) 27

Figura 4 - Ciclo de transmissão da leptospirose 28

Figura 5 – Estimativa de casos anuais de leptospirose por regiões 31

Figura 6 - Casos e óbitos de leptospirose no Brasil entre 2005 e 2019 32

Figura 7 - Casos de leptospirose no Brasil por região no ano de 2019 33

Figura 8 - Teste de MAT 34

Figura 9 - Arquitetura dos domínios de proteínas da família HtrA 40

Figura 10 - Atividades descritas pela HtrA 41

Figura 11 – Mapa do vetor de expressão pAE 48

Figura 12 – Mapa do vetor de expressão pET-SUMO 49

Figura 13 - Esquema geral do PCR para obtenção da construção final da LIC1111 fusionada com a porção do promotor mínimo (F6) da lipL32. 63

Figura 14 - Representação esquemática do vetor plasmídeo pMaORI 64

Figura 15 - Esquema geral do PCR para clonagem na estratégia de "overhang" 65

Figura 16 - Esquema geral do PCR para obtenção da construção final dos genes sintéticos da LIC11111, LIC11112 e LIC20143 fusionada com a porção do promotor lipL21. 66

Figura 17 - Esquema geral da técnica de transformação por eletroporação 68

Figura 18 - Esquema geral da técnica de transformação por conjugação. 69

Figura 19 - Cladograma das sequências de aminoácidos codificadas pelos genes (A) LIC11111, (B) LIC11112 e (C) LIC20143 72

Figura 20 - Modelo teórico 3D de LIC20143, LIC11112 e LIC11111 de *L. interrogans* serovar Copenhageni. 73

Figura 21 - Alinhamento de LIC20143 e LIC11112 de L. interrogans serovar Copenhageni......74

Figura 22 - Visualização dos fragmentos de DNA amplificados referentes aos genes estudados......75

Figura 23 - Géis de confirmação da ligação dos insertos nos vetores de expressão......75

Figura 24 - Análise da expressão das proteínas recombinantes em diferentes estirpes de *E. coli* por meio de SDS-PAGE (12%)......77

Figura 25 - Análise das frações de cultura bacteriana após indução de expressão das proteínas recombinantes utilizando anticorpo anti-His por western blotting.....77

Figura 26 - Análise das frações de cultura bacteriana por western blotting após indução em larga escala das proteínas recombinantes LIC11112 na estirpe BL21 (DE3).....78

Figura 27 - Análise das frações de cultura bacteriana após indução de expressão da rLIC11112 em três estirpes diferentes a 18 e 37 ºC.....79

Figura 28 - Análise das frações de cultura bacteriana após indução em larga escala das proteínas recombinantes LIC11112 na estirpe C43 (DE3)......80

Figura 29 - Análise das frações de cultura bacteriana após indução de expressão das proteínas recombinantes utilizando vetor pET-SUMO......81

Figura 30 - Análise da purificação da proteína recombinante rLIC11111 expressa com o vetor pAE.....82

Figura 31 - Análise da purificação da proteína recombinante rLIC11112 expressa com o vetor pAE.....83

Figura 32 - Análise da purificação da proteína recombinante rLIC20143 expressa com o vetor pAE.....83

Figura 33 - Estimativa da concentração das proteínas recombinantes purificadas.....84

Figura 34 - Análise da purificação da proteína recombinante rLIC11112 expressa com o vetor pET-SUMO.....85

Figura 35 - Análise da purificação da proteína recombinante rLIC11111 expressa com o vetor pET-SUMO.....85

Figura 36 - Espectros característicos de estruturas secundárias.....86

Figura 37 - Espectros gerados pela análise de dicroísmo circular para a

proteína recombinante LIC11112.....87

Figura 38 - Produção de anticorpos IgG pela imunização de camundongos com as proteínas recombinantes LIC11111, LIC11112 e LIC20143 88

Figura 39 - Análise das proteínas recombinantes por western Blotting utilizando o antissoro policlonal anti-LIC11111, anti-rLIC11112 e anti-rLIC20143 89

Figura 40 - Reatividade das proteínas recombinantes com amostras de soro humano infectados com leptospirose.....91

Figura 41 - Ensaio de degradação do substrato cromogênico para tripsina L-BAPA 92

Figura 42 - Ensaio de degradação do substrato fluorescente FTC-caseína 93

Figura 43 - Degradação da caseína pela proteína recombinante rLIC20143.....94

Figura 44 - Análise da conservação da LIC20143 em diferentes espécies de *Leptospira* 95

Figura 45 - Localização celular da rLIC20143 em *L. interrogans* virulenta e atenuada em cultura pela técnica de imunofluorescência.....97

Figura 46 - Localização por ELISA utilizando L. interrogans intacta e lisada....98

Figura 47 - Estudo de adesão das proteínas recombinantes rLIC11112 e rLIC20143 aos componentes da matriz extracelular......100

Figura 48 - Ação do sistema complemento dificultados pela interação do C4BP com a Leptospira.....102

Figura 49 - Atividade proteolítica adquirida pela Leptospira via sistema plasminogênio /plasmina 103

Figura 50 - Esquema geral da formação do coágulo de fibrina e como a *Leptospira* pode interferir.....104

Figura 51 - Estudo de adesão das proteínas recombinantes rLIC11112 e rLIC20143 aos componentes do plasma.....105

Figura 52 - Curvas de dose-resposta da ligação da proteína recombinante a LIC11112 aos componentes da matriz extracelular e plasma.....106

Figura 53 - Curvas de dose-resposta da ligação da proteína recombinante a LIC20143 aos componentes da matriz extracelular e plasma.....107

Figura 54 - Avaliação do papel dos resíduos de lisina da proteína recombinante LIC11112 e LIC20143 na interação com o plasminogênio.....108

Figura 55 - Conversão do plasminogênio purificado e presente no soro normal humano (SNH) ligado às proteínas recombinantes em plasmina 110

Figura 56 - Inibição do coágulo de fibrina pela proteína rLIC11112......112

Figura 57 - Expressão dos genes LIC11111, LIC11112 e LIC20143 nas estirpes *L. interrogans* M20 e *L. interrogans* L1- 130 113

Figura 58 - Géis de confirmação da amplificação do gene da LIC11111 para fusão com a versão mínima do promotor (F6) da lipL32 e da ligação do inserto no vetor pMaORI......116

Figura 59 - Expressão do gene LIC11111 *L. interrogans* M20, *L. biflexa* sorovar Patoc e *L. biflexa* sorovar Patoc transformada com o plasmídeo pMaORI-LIC11111.....116

Figura 60 - Géis de confirmação da amplificação do gene da LIC20143, do promotor da lipL32 e da ligação do inserto fusionado no vetor pMaORI.....118

Figura 61 - Confirmação da ligação do gene LIC11112 fusionado ao promotor do gene da lipL32 no vetor pMaORI 120

Figura 62 - Expressão genica da LIC11112 e LIC20143 fusionadas com o promotor completo da lipL32 e transformadas em L. biflexa sorovar Patoc ...121

Figura 63 - Expressão do gene LIC11111 em *L. interrogans* M20, *L. biflexa* sorovar Patoc e *L. biflexa* sorovar Patoc transformada com o plasmídeo pMaORI contendo a LIC1111 fusionada ao promotor da lipL21. 122

Figura 64 - Ensaio de localização da bactéria recombinante LIC11111 intacta 123

Figura 65 - Géis de confirmação da reamplificação dos genes LIC11111, LIC11112 e LIC20143 sintéticos fusionados com o promotor da lipL21 e ligação do inserto no vetor pMaORI 124

Figura 66 - Expressão do gene LIC11111 *L. interrogans* M20, *L. biflexa* sorovar Patoc e *L. biflexa* sorovar Patoc transformada com o plasmídeo pMaORI. 126

Figura 67 - Western blottting para avaliação da expressão das proteínas codificadas pelos genes da LIC1111, LIC11112 e LIC20143 na *L. biflexa* 127

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sequência de oligonucleotídeos empregada para amplificação do gene da LIC11111 e da LIC11112 para diversos os vetores de expressão pAE e pET-SUMO (small uniquitin-like modifier) 47

Quadro 2 - Sequências de oligonucleotídeos sintetizados para avaliação da expressão gênica 57

Quadro 3 - Sequências de oligonucleotídeos sintetizados para obtenção da sequência a ser ligado no pMaORI. 63

Quadro 4 - Oligonucleotídeos usados na estratégia de clonagem de "overhang" 65

Quadro 5 - Sequências de oligonucleotídeos sintetizados para obtenção da sequência a ser ligado no pMaORI. 66

Quadro 6 - Sequência dos primers para confirmação da ligação no vetor pMaORI 68

Quadro 7 – Resumo das características preditas pelas análises de bioinformática para os genes em estudo 71

Quadro 8 - Massa molecular e ponto isoelétrico (PI) teórico das proteínas recombinantes estudadas. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vacinas disponíveis contra leptospirose para humanos 35

Tabela 2 - Análise dos espectros do CD e da predição com base na sequência de aminoácidos obtidos pelo programa CAPITO......87

Tabela 3 - Constantes de dissociação apresentadas pela proteína recombinante rLIC11112 e rLIC20143 107

Tabela 4 - Resíduos de lisina presentes nas proteínas codificadas pelos genes LIC11112 e LIC20143.....109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ACA	Ácido aminocapróico
Amp	Ampicilina
BSA	Albumina de soro bovino
C4bp	C4 *binding protein*
cDNA	DNA complementar
CD	Dicroísmo circular
Da	Dalton
DAP	Diaminopimelato
DAPI	4′,6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etinodiamino teracético
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
EMJH	Meio de cultura Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris
HtrA	*High temperature requirement* A
IPTG	Isopropil β-tiogalactosídeo
FITC	*Fluorescein isothiocyanate*
g	Gravidade
Kb	Kilobase
K_D	Constante de dissociação
LB	Meio Luria-Bertani contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de triptona e 1% de NaCL
LIC	*Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni
LPHS	Síndrome pulmonar hemorrágica associada a leptospirose
LPS	Lipopolissacarídeo
MAT	Teste de microaglutinação
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	o-fenilenodiamina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Pb	Pares de base
PBS	Tampao de fosfato salino
PBS-T	PBS contendo 0,05% de Tween-20
PCR	*Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)
PMSF	Fenilmetilsulfonifluor
RBS	Sítio de ligação do ribossomo
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RT	Transcriptase reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNH	Soro normal humano
SUMO	*Small ubiquitin modifier*
TA	Temperatura de anelamento
TAE	Tris-acetato EDTA
Tm	Temperatura de melting
ULP1	*Ubiquitin-like-specific protease* 1
uPA	Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 24

1.1. Microbiologia da *Leptospira* spp. 24

1.2. Leptospirose 27

1.2.1. Incidência no mundo 30

1.2.2. Incidência no Brasil 31

1.2.3. Diagnóstico e tratamento 33

1.2.4. Vacinas como método preventivo 35

1.3. Mecanismos de patogenicidade 37

1.4. *High Temperature Requirement* A (HtrA) 39

2. OBJETIVOS 43

2.1. Objetivos gerais 43

2.2. Objetivos específicos 43

3. METODOLOGIA 44

3.1. Estirpes e soros utilizados 44

3.2. Análises de bioinformática 45

3.3. Preparação do DNA genômico 46

3.4. Clonagem 46

3.4.1. Clonagem no vetor de expressão pAE 47

3.4.2. Clonagem no vetor de expressão pET-SUMO 48

3.5. Transformação de bactérias *E. coli* 49

3.6. Indução da expressão das proteínas recombinantes 50

3.7. Purificação das proteínas recombinantes 51

3.8. Espectroscopia circular 52

3.9. Imunização 52

3.10. Titulação do soro de animais imunizados 53

3.11. Detecção de anticorpos IgG em soros de humanos diagnosticados com leptospirose 54

3.12. Imunoblotting 54

3.13. Extração de RNA e transcrição reversa (RT-PCR) 55

3.14. Real time RT-PCR (RT-qPCR) 56

3.15. Componentes biológicos 58

3.16. Ensaio de adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular e plasma. 58

3.17. Curva de dose resposta da ligação das proteínas recombinantes aos componentes 59

3.18. Avaliação da participação dos resíduos de lisina das proteínas

recombinantes na interação com o plasminogênio 59

3.19. Inibição do coágulo de fibrina 60

3.20. Avaliação da conservação proteica em diferentes estirpes de *Leptospira* por *western blotting* 60

3.21. Imunofluorescência 61

3.22. Ensaios enzimáticos.....61

3.23. Construção *L. biflexa* sorovar Patoc recombinante.....62

3.23.1. Estratégias de clonagem 62

3.23.2. Transformação de L. biflexa sorovar Patoc.....67

3.23.2.1. Eletroporação.....67

3.23.2.2. Conjugação.....68

3.24. Comitê de ética animal e humano 70

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 70

4.1. Análise bioinformática 70

4.2. Clonagem.....74

4.3. Avaliação da expressão das proteínas.....76

4.3.1. Vetor de expressão pAE.....76

4.3.2. Vetor de expressão pET-SUMO.....80

4.4. Purificação.....81

4.4.1. Purificação das proteínas expressas pelo vetor pAE 81

4.4.2. Purificação das proteínas expressas pelo vetor pET-SUMO 84

4.5. Dicroísmo Circular.....85

4.6. Avaliações imunológicas 88

4.7. Reatividade com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose 89

4.8. Ensaio enzimático.....91

***4.9.* Ensaio de conservação da LIC20143 frente a diferentes estirpes de *Leptospira*.....94**

4.10. Localização celular da proteína codificada pelo gene da LIC20143...95

4.10.1. Imunofluorescência 95

4.10.2. ELISA 97

4.11. Adesão das proteínas rLIC11112 e rLIC20143 a componentes da matriz extracelular e plasma 98

4.11.1. Matriz extracelular 98

4.11.2. Componentes do plasma.....101

4.12. Curvas de dose-resposta dos componentes que apresentaram interação com a rLIC11112 e rLIC20143 105

4.13. Caracterização da interação de rLIC11112 e rLIC20143 com plasminogênio.....108

4.14. Ativação do plasminogênio ligado as proteínas recombinantes em plasmina.....109

4.15. Inibição da formação do coágulo de fibrina.....111

***4.16.* Avaliação da presença dos transcritos em *L. interrogans* sorovar Copenhageni nas estirpes atenuada e virulenta.....112**

4.17. Construções de plasmídeos para transformação de *L. biflexa* sorovar Patoc e avaliação do ganho de função.....114

4.17.1. *L. biflexa* sorovar Patoc recombinante LIC11111 fusionada a porção mínima (F6) do promotor do gene da lipL32 115

4.17.2. *L. biflexa* sorovar Patoc recombinante LIC11112 e LIC20143 fusionada a porção completa do promotor do gene da lipL32 117

4.17.3. *L. biflexa* sorovar Patoc recombinante LIC1111, LIC11112 e LIC20143 fusionadas ao promotor da lipL21 121

5. CONCLUSÕES 128

REFERÊNCIAS 130

APÊNDICES 153

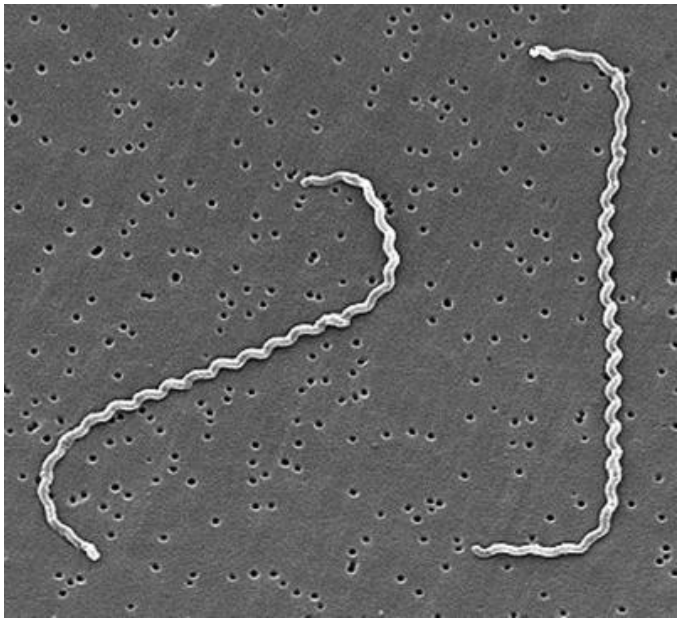
ANEXO 157

1. INTRODUÇÃO

1.1. Microbiologia da *Leptospira* spp.

As leptospiras são bactérias finas, enroladas de forma helicoidal, bastante móveis e possuem entre 6 e 20 µm de comprimento (FAINE et al., 1999; HAAKE, 2000; HAAKE et al., 2002; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; LEVETT, 2001). São espiroquetas do gênero *Leptospira*, que pertencem a família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales (FAINE et al., 1999). Elas se destacam morfologicamente das outras espiroquetas por apresentarem em suas extremidades uma característica única em forma de gancho, que se assemelha a um ponto de interrogação (**Figura *1***).

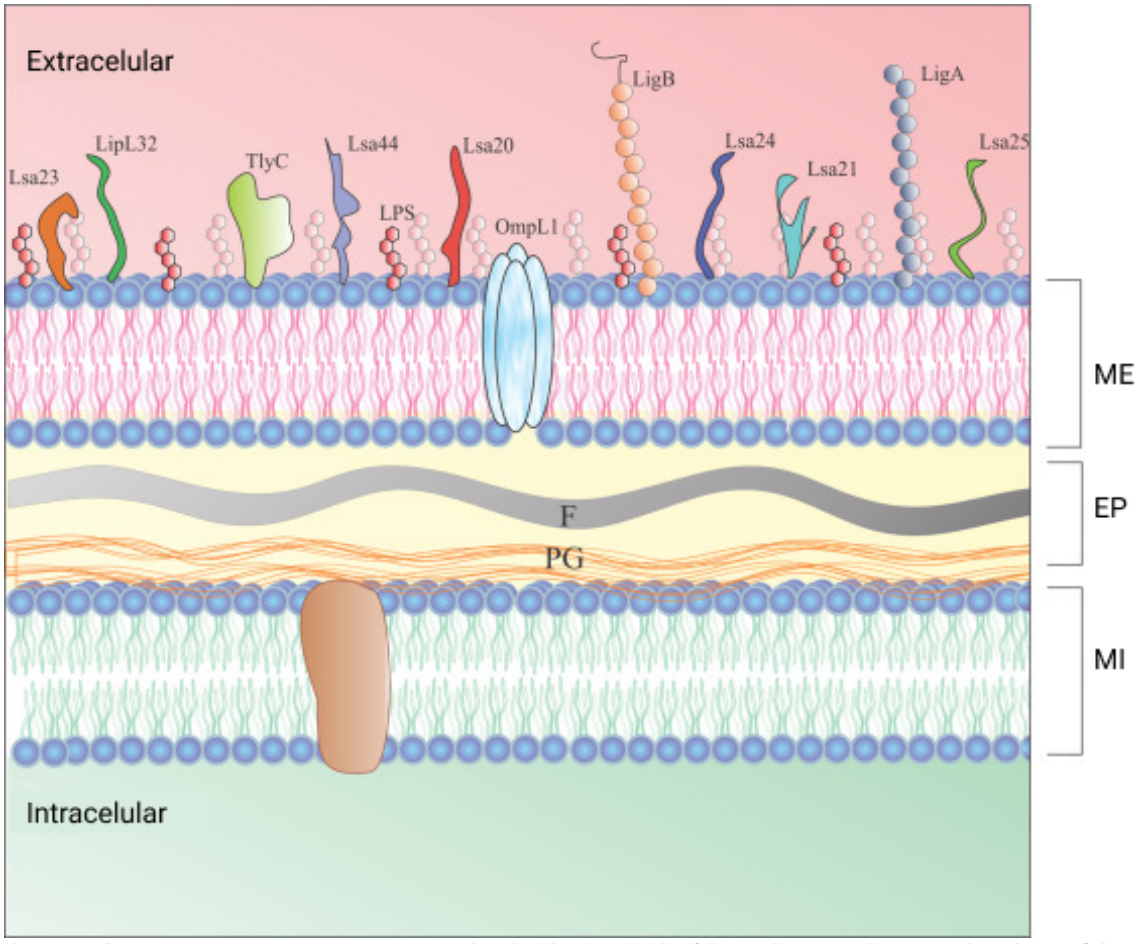
Figura 1 - Morfologia da *Leptospira* spp.



Microscopia eletrónica de varredura de *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae.
Fonte: Levett (2001).

As membranas das leptospiras são bastante peculiares, já que possuem características presentes tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas (**Figura *2***). A dupla membrana e a presença de lipopolissacarídeos de superfície (LPS) são características de bactérias Gram-negativas, já a forte associação de uma espessa camada de peptideoglicano com a membrana citoplasmática é uma característica de bactérias Gram-positivas (BHARTI et al., 2003; HAAKE; MATSUNAGA, 2010; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Figura 2 - Modelo da arquitetura da membrana de *Leptospira* spp.



As leptospiras apresentam uma camada dupla, constituída pela membrana citoplasmática ou interna (MI) e externa (ME), dentre as quais se localiza o espaço periplasmático (EP), no qual se encontram os dois endoflagelos (F) e uma espessa camada de peptideoglicano (PG), fortemente associada a MI. O componente predominante da ME são os lipopolissacarideos (LPS), cujas diferenças estruturais e químicas determinam a diversidade antigênicas dessas bactérias. Estão demonstradas algumas proteínas expostas já descritas como tendo características de adesinas.
Fonte: Adaptado de Fernandes et al. (2016).

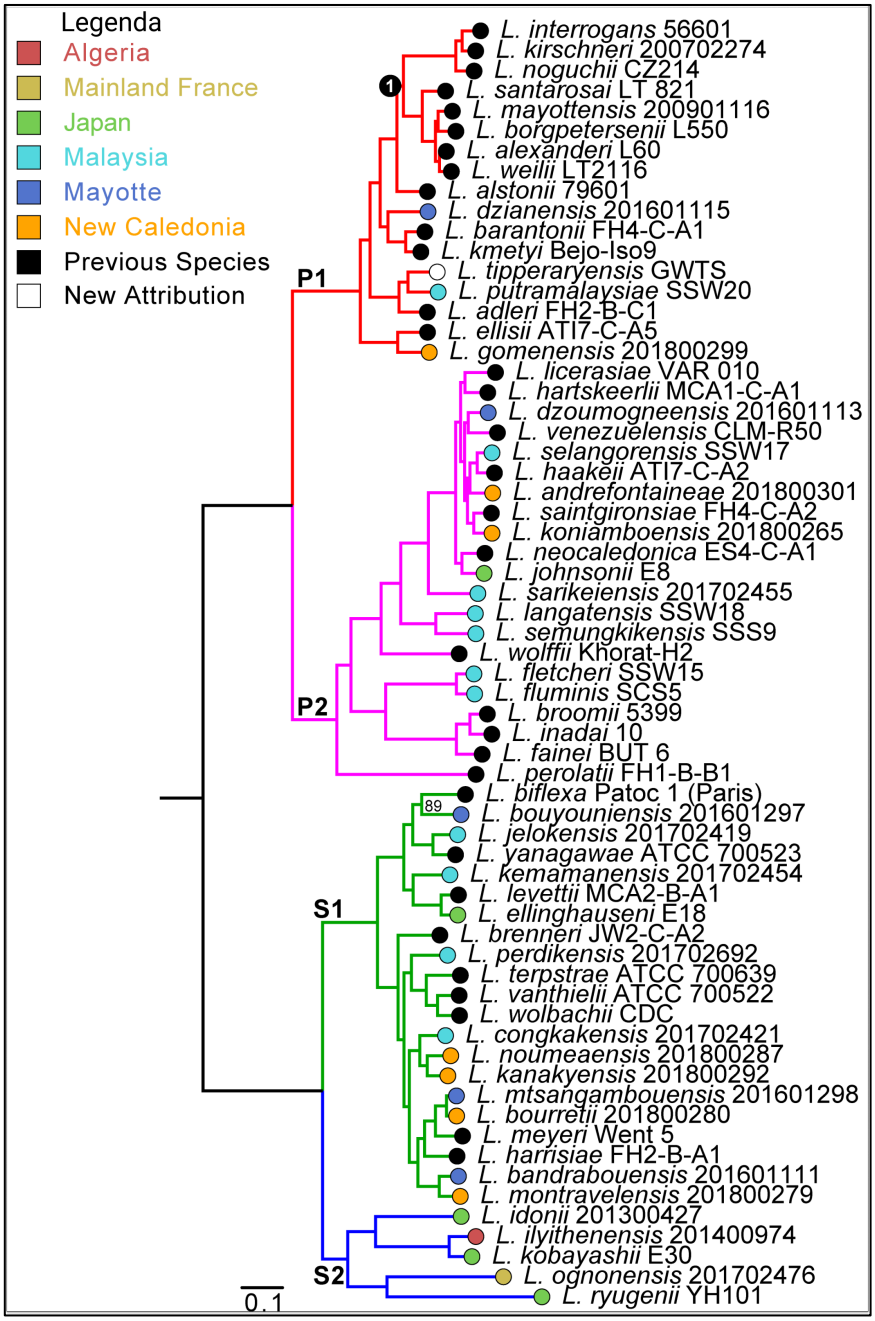
O LPS é o componente majoritário de superfície em leptospiras. Ele é composto por um lipídeo A, uma parte central (*core*) e polissacarídeo ou antígeno O (FAINE et al., 1999). Essa estrutura se assemelha a de outras bactérias Gram-negativas, porém foi demonstrado ser menos endotóxica do que a de *Escherichia coli,* por exemplo (FAINE et al., 1999). Essa toxicidade reduzida pode estar associada as características únicas apresentadas pelo lipídeo A, como a metilação do único fosfato contido no dissacarídeo de glucosamina (HAAKE; LEVETT, 2015; QUE-GEWIRTH et al., 2004); essa diferença pode estar relacionada com o fato do LPS de *Leptospira* ser incapaz de interagir com o receptor Toll-like-4 humano (TLR4) (BONHOMME et al., 2020; CHASSIN et al., 2009; NAHORI et al., 2005; WERTS et al., 2001).

O LPS é responsável pela classificação sorológica das leptospiras. Já foram identificadas de mais de 300 sorovares baseados na sua expressão diferencial (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; BHARTI et al., 2003; PICARDEAU, 2017). Essa classificação é realizada de acordo com o teste MAT (microaglutinação), o qual avalia a capacidade de anticorpos se aglutinarem após o reconhecimento de epítopos antigênicos presentes na porção variável do LPS (HAAKE; ZÜCKERT, 2015).

Além da classificação sorológica, as leptospiras também são classificadas geneticamente por hibridização de DNA. Nessa classificação são apresentadas 22 espécies, sendo 9 patogênicas (*L. interrogans, L. kirschneri, L. borgpetersenii, L. santarosai, L. noguchii, L. weilii, L. alexanderi, L. alstoni, L. kmetyi*), 7 saprofiticas de vida livre (*L. biflexa, L. yanagawe, L. wolbachii, L. meyeri, L. vanthielli, L. terpstrae, L. idonii*) e 5 intermediárias (*L. inadai, L. broomii, L. fainei, L. wolfii e L. licerasiae*) (FOUTS et al., 2016).

VINCENT et al., 2019 propôs um novo método de classificação das leptospiras baseado no sequenciamento genômico, comparando os valores de identidade média de nucleotídeos (*avarage nucleotide identity* - ANI). A divisão proposta é composta de 2 clados: P e S, e 4 subclados: P1 (antiga patogênica), P2 (antiga intermediaria), S1 e S2 (antiga saprofítica). Foram identificados um total de 64 espécies, sendo 4 novas espécies no grupo P1 (*L. gomenensis*, *L. putramalaysiae*, *L. dzianiensis* e *L. tipperaryensis)*, 10 espécies no grupo P2 e 16 espécies nos grupos S1 e S2 (**Figura *3***).

Figura 3 - Árvore filogenética baseado nas sequências de identidade média de nucleotídeos (ANI)



Representação das 64 espécies identificadas. As chaves estão coloridas de acordo com os 4 subgrupos: P1 (vermelho), P2 (roxo), S1 (verde) e S2 (azul).
Fonte: Adaptado de Vincent et al. (2019).

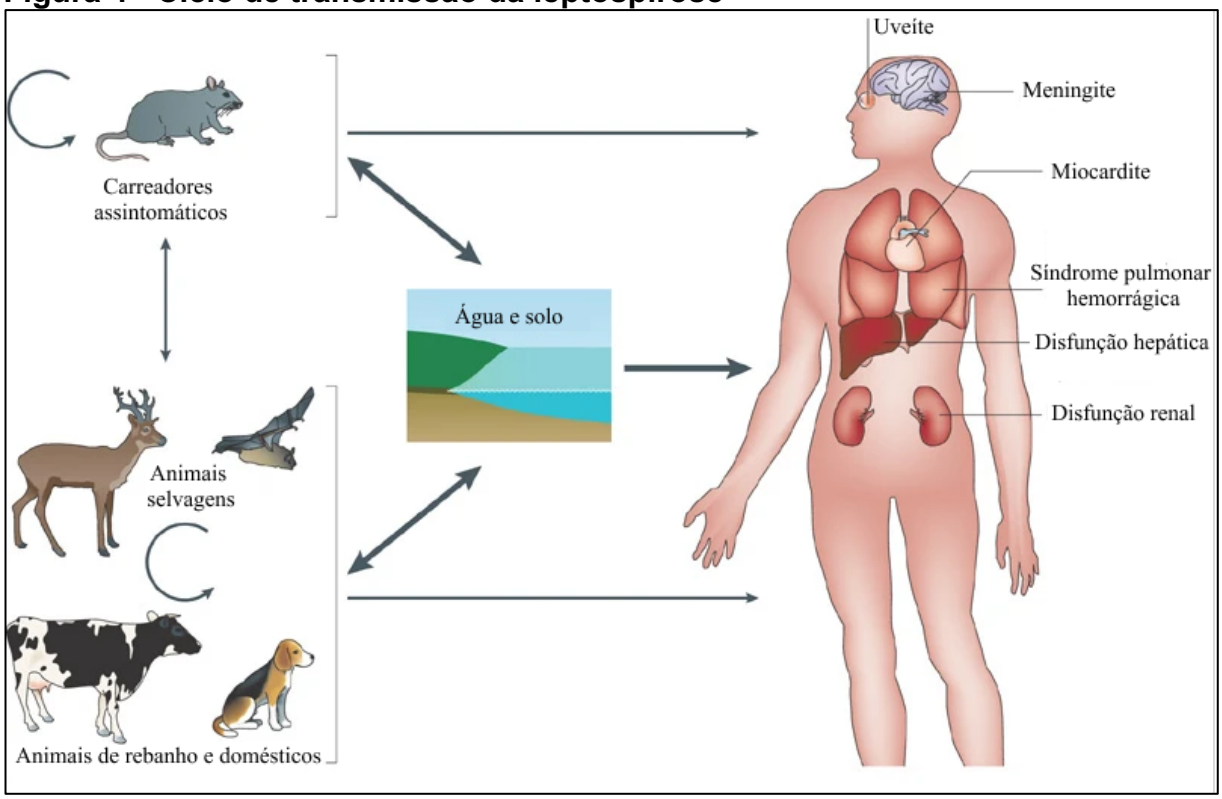
1.2. Leptospirose

A leptospirose, uma doença causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, representa um problema de saúde pública mundial que afeta principalmente países em desenvolvimento (LEVETT, 2001).

O homem é o hospedeiro acidental da *Leptospira*, podendo se infectar por meio do contato direto com urina de animais contaminados ou indiretamente através do contato de água ou solos contaminados com essas urinas (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999). As bactérias penetram o indivíduo através de pequenos ferimentos encontrados na pele íntegra, por poros dilatados, quando há longa exposição em ambientes úmidos contaminados, ou pelas membranas das mucosas do olho, nariz e garganta (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; PLANK; DEAN, 2000).

Após a penetração, as leptospiras são capazes de disseminar-se pelo sistema linfático ou pela corrente sanguínea até atingir os órgãos (**Figura *4***). A severidade da doença está relacionada com o estado imunológico e idade do hospedeiro, com o tipo de estirpe ou sorovar bacteriano e a concentração do inóculo infectante da bactéria (CINCO, 2010; FAINE et al., 1999).

Figura 4 - Ciclo de transmissão da leptospirose



As leptospiras são transmitidas para os humanos por contato direto com urina de animais contaminados ou por exposição a solos e águas contaminadas com essa urina. As bactérias penetram a pele ou mucosas e se disseminam através da corrente sanguínea até atingir os órgãos. O homem é considerado o hospedeiro acidental e terminal da doença.
Fonte: Adaptado de Ko; Goarant; Picardeau (2009).

A leptospirose é considerada uma doença infecciosa febril cujas manifestações clínicas podem variar desde quadros assintomáticos, leves e de evolução benigna a

formas mais graves. O período de incubação da doença tem uma media de 5-14 dias, podendo variar entre 2-30 dias (FAINE et al., 1999).

A fase inicial da doença é caracterizada por febre, calafrios, dor de cabeça e muscular, muito frequentemente confundida com outras doenças febris, como gripe e dengue, sendo que na maioria dos pacientes os sintomas desaparecem após a primeira semana.

Entre 5 a 15% dos casos, o quadro clínico pode evoluir para uma condição mais severa com complicações generalizadas, conhecida como síndrome de *Weil* (COSTA et al., 2015; FAINE et al., 1999; PLANK; DEAN, 2000). Caracterizada por hemorragia, falência renal e icterícia, com lesões endoteliais e focos hemorrágicos observados em todos os órgãos afetados. O quadro ictérico se dá pelo dano hepatocelular e rompimento das juncões intercelulares entre os hepatócitos, culminando na liberação de bilirrubina no organismo (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Complicações hemorrágicas são comuns e normalmente associadas a anormalidades de coagulações. Síndrome hemorrágica pulmonar associada a leptospirose (LPHS) ocorre devido a uma severa hemorragia dos alvéolos pulmonares levando a óbito 50% dos casos (HAAKE; LEVETT, 2015).

Muitas vezes, pelos sintomas iniciais serem confundidos com os de outras doenças, o diagnóstico é dificultado e consequentemente não é empregado o tratamento adequado, podendo culminar no óbito do paciente (FAINE et al., 1999).

Em animais de corte com finalidade comercial a leptospirose apresenta um problema econômico. Devido à epidemiologia complexa e dinâmica, o controle da doença ainda é controverso e frustrante (MARTINS; LILENBAUM, 2017). Em bovinos a doença pode causar abortos, fetos natimortos e nascimento de descendentes fracos (NDENGU et al., 2017; SANHUEZA; HEUER; WEST, 2013). Na Argentina, em 2011, houve uma perda de aproximadamente US$ 150.000 devido a morte de 100 bezerros e à vacinação e tratamento de 1.300 sobreviventes ao longo do ano (DRAGHI et al., 2011). Na França, o custo médio anual da leptospirose em rebanhos de gado leiteiro foi estimado sendo entre US$ 97 a 2.611 por vaca abortada (AYRAL, 2013). Dessa maneira, o controle da leptospirose bovina, embora exija vigilância constante, é possível, sendo o recomendado um programa integrado baseado em i) antibióticos, ii) boas práticas de manejo e iii) vacinação e, apesar dessas estratégias reduzirirem em grande parte a falha reprodutiva e os riscos econômicos, não é um sistema a prova de falhas e não impede a transmissão das leptospiras (MARTINS; LILENBAUM,

2017).

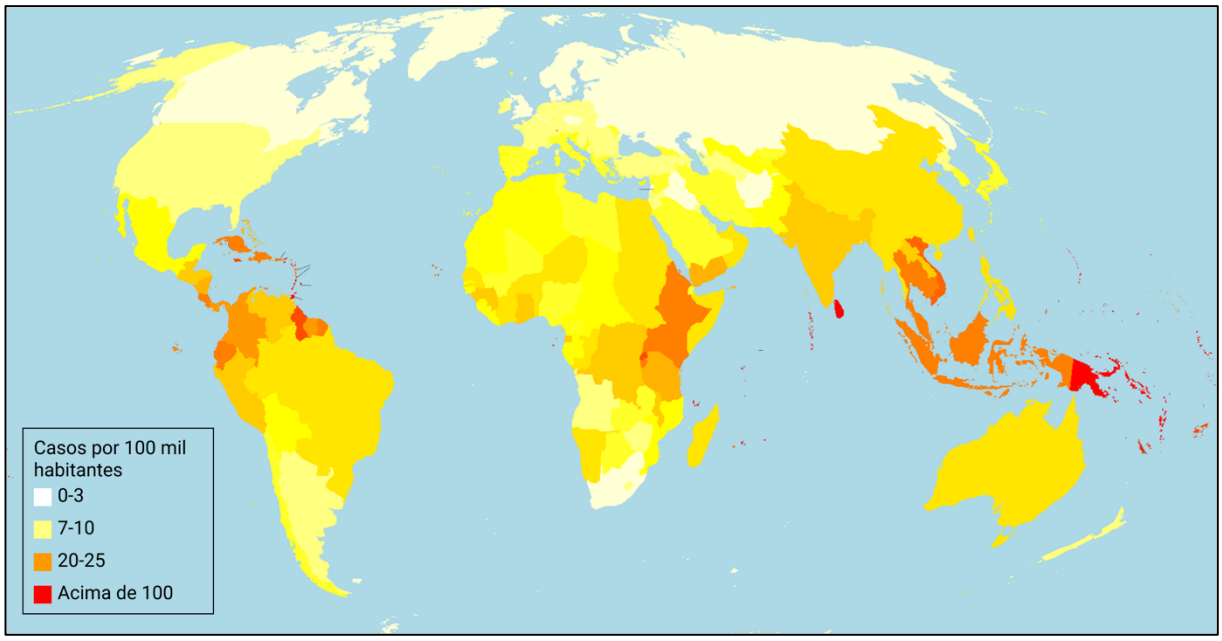
1.2.1. Incidência no mundo

A leptospirose foi considerada uma doença ocupacional, relacionada com atividades de mineração, tratamento de esgoto, atividades de pecuária, medicina veterinária e empreitadas militares, onde a chance de exposição ao patógeno é mais elevada (BHARTI et al., 2003). Com a introdução a medidas de proteção, os casos de contaminação ocupacional vêm diminuindo; entretanto devido à precariedade de infraestrutura sanitária em grandes centros urbanos, populações que vivem em aglomerações com altas infestações de roedores, associados às estações chuvosas e às inundações, propiciam a disseminação e a persistência das leptospiras no ambiente, favorecendo o contato do homem com águas contaminadas e facilitando, assim, a ocorrência de surtos principalmente em países em desenvolvimento (COSTA et al., 2015; RUSSELL et al., 2003; TREVEJO et al., 1998).

COSTA et al., 2015 estimam que anualmente ocorram aproximadamente 1 milhão de casos de leptospirose no mundo e 59 mil mortes. As áreas mais afetadas são as tropicais, sendo que 73% dos casos e mortes ocorrem nos países situados entre os trópicos de câncer e capricórnio (**Figura *5***). Nos países temperados, o fator de risco está relacionado com a atividade recreacional. Em 2012, no Sri Lanka, seis participantes de uma excursão para praticar *rafting* apresentaram sintomas de leptospirose e uma investigação epidemiológica mostrou que eles possuíam anticorpos antileptospira (AGAMPODI et al., 2015).

Homens jovens são os mais afetados, principalmente entre as idades 20 e 29 anos, porém a maioria das mortes ocorrem em homem entre 50 e 59 anos (COSTA et al., 2015).

Figura 5 – Estimativa de casos anuais de leptospirose por regiões

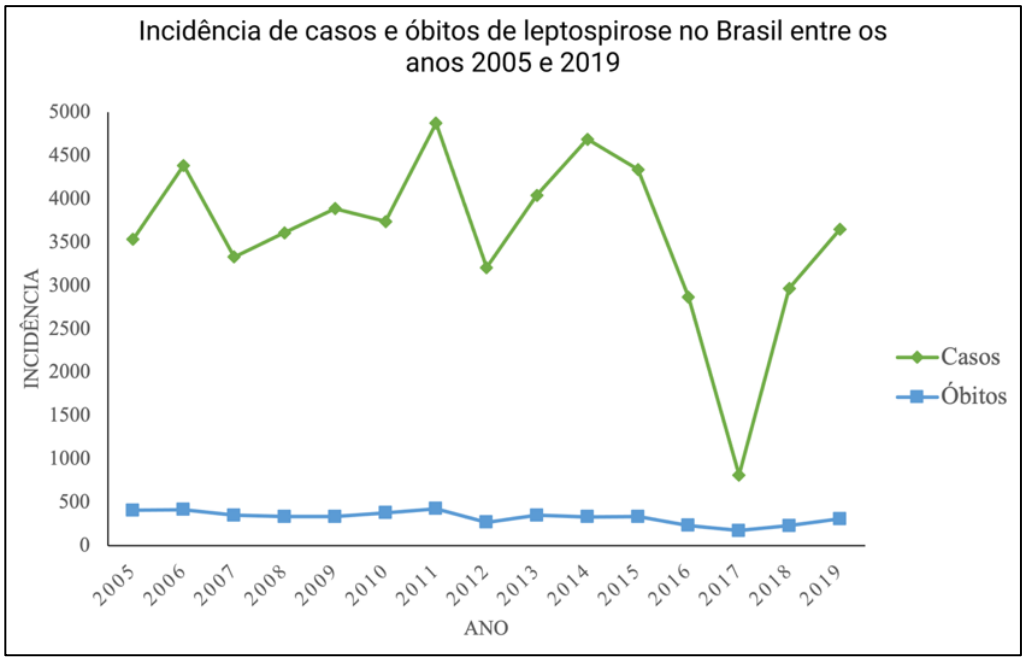


Representação de casos de leptospirose no mundo. As regiões mais afetadas são representadas pela cor mais escura. As áreas mais afetadas são, na maioria, países da faixa tropical, onde se concentram a maioria dos países em desenvolvimento.
Fonte: Adaptado de Costa et al. (2015).

1.2.2. Incidência no Brasil

No período de 2005 a 2019, houve registros de casos em todas as regiões do país, com uma média anual de 3.596 casos e uma média de 325 óbitos (**Figura *6***) (Ministério de Saúde/SVS/Sinan, 2020), com uma incidência média de 1,7 casos por 100 mil habitantes no país por ano. No ano de 2019, os maiores registros de casos ocorreram nas regiões Sul e Sudeste (**Figura *7***), sendo, normalmente, os mais acometidos pela doença jovens/adultos do sexo masculino. Isso pode estar relacionado com o fato de que homens jovens estão mais expostos à doença pela sua maior participação em situações ou práticas que facilitem o contato com as fontes de infecção, principalmente em casos de alagamentos e enchentes (PELISSARI et al., 2011).

Figura 6 - Casos e óbitos de leptospirose no Brasil entre 2005 e 2019

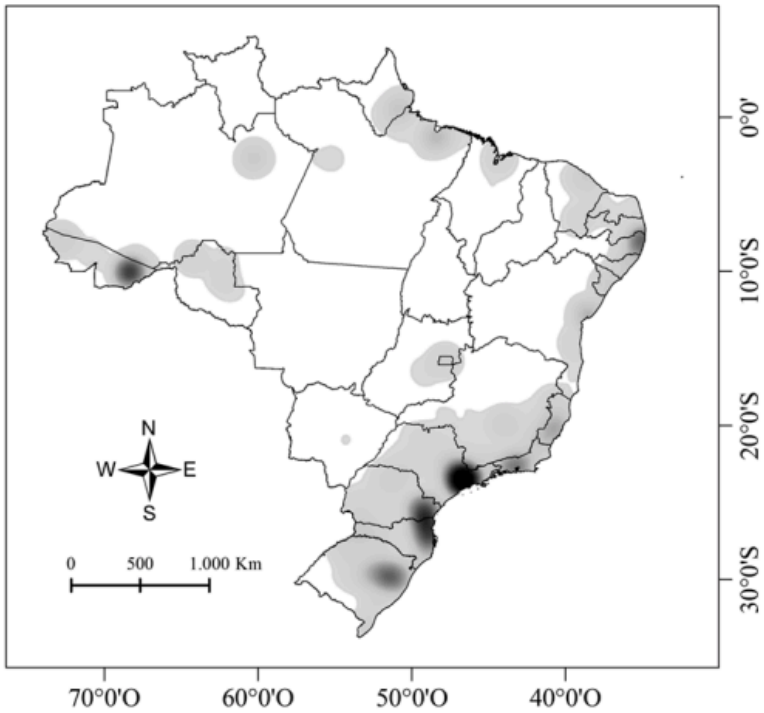


Dados obtidos em agosto de 2021.
Fonte: Sinam/SVS/MS.

Os números reais podem ser 10 a 20 vezes maior considerando que muitos pacientes não são diagnosticados corretamente, ou os hospitais não informam os casos (RODRIGUES, 2017). A terapia de suporte é importante para tratar os efeitos da leptospirose, como desidratação, febre, hipotensão, falência renal e hemorragia. A doença representa um problema econômico para o Sistema de Saúde Pública, pois o tratamento requer hospitalização, em alguns casos diálise renal. Esta situação piora com a associação de leptospirose com síndrome pulmonar hemorrágica aumentado para 50% a mortalidade destes pacientes (MACIEL et al., 2008; NICODEMO et al., 1997; PANAPHUT; DOMRONGKITCHAIPORN; THINKAMROP, 2002).

Assim, a melhor estratégia para combater este problema de saúde pública é a adoção de medidas preventivas como diagnósticos específicos e eficazes e com imunização.

Figura 7 - Casos de leptospirose no Brasil por região no ano de 2019



Representação de casos de leptospirose no Brasil. As regiões mais afetadas são representadas pela cor mais escura no mapa.
Fonte: Adaptado de Marteli et al. (2020)

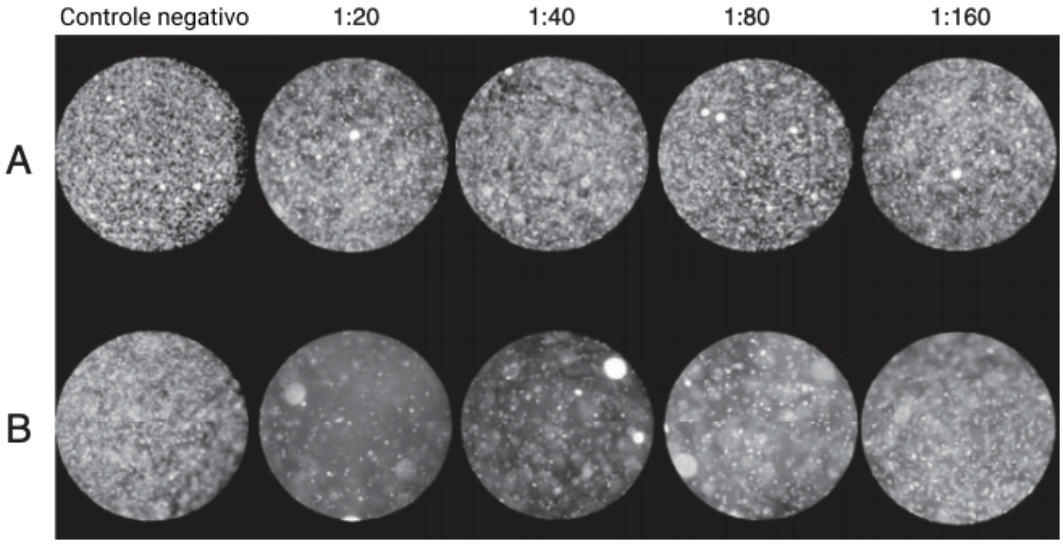
1.2.3. Diagnóstico e tratamento

Controlar doenças infeciosas requer a disponibilidade de diagnósticos eficientes, sendo especialmente difícil para leptospirose devido aos sintomas da doença serem inespecíficos, apresentando um quadro muitas vezes heterogêneo (COSTA et al., 2015; LEVETT, 2001). Segundo Sasaki et al. (1993), apenas 30% dos casos confirmados de leptospirose foram suspeitos pelos médicos durante o diagnóstico clínico inicial. O teste considerado “padrão” para diagnostico da leptospirose é o de microaglutinação (MAT, *microscopic agglutination test*), sendo específico para determinar sorovares ou sorogrupos de *Leptospira* spp. (FAINE et al., 1999).

MAT é uma técnica sorológica que detecta anticorpos aglutinantes contra epítopos dependentes do sorovar de *Leptospira* spp. (GORIS; HARTSKEERL, 2014). Diferentes diluições do soro do paciente são misturados com suspensões de leptospiras vivas mantidas recorrentemente em laboratório, e o título do soro é considerado a diluição máxima que fornece 50% de aglutinação após a visualização

em microscópio de campo escuro (***Figura 8***) (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007). O diagnóstico sorológico de leptospirose por MAT em si não é particularmente difícil, mas a qualidade e eficácia do teste depende da disponibilidade de um número suficientemente grande de estirpes representativas de leptospiras, além de ser custoso, realizado apenas em laboratórios de referência e exigir uma mão de obra capacitada (BHARTI et al., 2003; CHAPPEL et al., 2004; GORIS; HARTSKEERL, 2014).

Figura 8 - Teste de MAT



Microscopia de campo escuro (aumento de 200x) da aglutinação de leptospiras com soro em várias diluições. (A) soros negativos, (B) soros reativos (até diluição de 1:80).
Fonte: Adaptado de Goris; Hartskeerl (2014).

Um resultado negativo a reação de MAT, mesmo em amostras em série, não descarta a possibilidade de infecção, uma vez que o paciente pode estar infectado com um sorovar diferente não incluído durante a realização do exame, ou ainda ter tido seu soro coletado muito no início da infecção, onde ainda não houve a produção de anticorpos (soroconversão) (GORIS; HARTSKEERL, 2014; PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007).

Com a confirmação da doença, o tratamento envolve a administração de antibióticos como oxitetraciclina, doxiciclina e penicilina (BHARTI et al., 2003; BRETT-MAJOR; COLDREN, 2012; DAHER; NOGUEIRA, 2000; RUSSELL, 1958). Os antibióticos parecem prevenir o avanço dos sintomas e diminuir as chances de sequelas, contribuindo para um possível impedimento de evolução para formas mais

graves da doença.

1.2.4. Vacinas como método preventivo

No Brasil não há vacinas humanas aprovadas para uso, porém países como França, Cuba, China e Japão, possuem vacinas do tipo bacterinas que são aprovadas para uso em populações de risco (***Tabela 1***) (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Esse tipo de vacina consiste basicamente de bactérias inativadas ou preparações de membrana de *Leptospira* patogênicas, induzindo uma resposta imune pela produção de anticorpos principalmente contra o LPS presente na bactéria (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Esse tipo de vacina apresenta diversas desvantagens que incluem: reações adversas relacionado ao LPS bacteriano e/ou componentes do meio de cultura, proteção de curto prazo (o LPS não é capaz de induzir as células B de memória, já que é um antígeno T independente) e a falta de proteção cruzada, já que somente ocorrerá proteção contra as bactérias incluídas na preparação vacinal (ADLER, 2015; HAAKE; LEVETT, 2015; MCBRIDE et al., 2005; ZUERNER, 2015).

Tabela 1 - Vacinas disponíveis contra leptospirose para humanos

País	Tipo vacinal	Componentes vacinais	Referências
Cuba	Trivalente Bactéria inativada	Sorogrupo Canicola sorovar Canicola; Sorogrupo Icterohemorragiae sorovar Copenhageni; Sorogrupo Pomona sorovar Mozdok	(MARTÍNEZ et al., 2004)
Franca	Monovalente Bactéria inativada	Sorogrupo Icterohemorragiae	(LAURICHESSE et al., 2007)
Japão	Polivalente Bactéria inativada	Sorovares Australis, Autumnalis, Hebdomadis e Copenhageni	(KOIZUMI; WATANABE, 2004)
China	Polivalente Bactéria inativada	Sorovares Lai, Linhai, Automnalis, Canicola, Pomona, Australis e Hebdomadis	(XU et al., 2005)
	Bivalente Preparacao de membrana externa	Sorogrupo Icterohemorragiae e Hebdomadis	(CHENG; QIN; XIE, 2001)

Fonte: Adaptado de Xu; Ye (2017).

Essas desvantagens são a explicação mais provável para a não adoção de bacterinas pelos países em desenvolvimento, a maioria afetados pela leptospirose. Apesar das desvantagens para o uso de bacterinas, elas reduziram significativamente

a incidência da doença e ainda permanecem uma das estratégias mais viáveis para controlar a infecção em humanos (XU; YE, 2017).

Em animais de corte, mais especificamente em gado, a imunização é o método de controle mais barato e representa uma medida essencial para o controle da leptospirose (LILENBAUM; MARTINS, 2014). Porém, as vacinas para uso comercial são compostas de bacterinas e sua eficácia é falha na prevenção da colonização renal, permitindo eliminação de leptospiras na urina (BOLIN; ALT, 2001), além de ser bastante dispendioso, já que a vacinação ocorre a cada 6 meses (PLUNKETT et al., 2013; RINEHART et al., 2012).

O avanço tecnológico tem permitido o desenvolvimentos de outras tecnologias, como a vacinologia reversa (VR), que utiliza a bioinformática para buscar possíveis candidatos vacinais, permitindo a identificação de proteínas-alvo (GRASSMANN et al., 2017; SETTE; RAPPUOLI, 2010; VALIDI et al., 2018). Com o sequenciamento do genoma da espiroqueta *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004b, 2004a) mais de 250 proteínas de membrana externa foram identificadas, contribuindo para a identificação de alvos vacinais pela VR.

Em 1999, Haake e colaboradores publicaram o primeiro trabalho utilizando proteínas recombinantes de *Leptospira* como candidato vacinal. As proteínas recombinantes OmpL1 e LipL41 demonstraram ter um efeito protetor sinérgico em hamsters desafiados com *L. kirschineri* serovar Grippotyphosa (HAAKE et al., 1999). A partir dessa data, muitos estudos vem sendo feitos com a intenção de obtenção de uma vacina de subunidade e diversos antígenos proteicos vem sendo testados (ATZINGEN et al., 2010, 2012; CONRAD et al., 2017; DA CUNHA et al., 2019; EVANGELISTA; LOURDAULT, 2020; FERNANDES et al., 2017; GAMBERINI et al., 2005; GRASSMANN et al., 2017; HAAKE et al., 1999; KUMARI et al., 2018; LIN et al., 2016; LLANOS SALINAS et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2020; YAN et al., 2009, 2010).

Imunização genética também tem recebido atenção considerável para o desenvolvimento de vacina de nova geração (MIURA et al., 2015; XU; YUEN; LAM, 2014). Resumidamente, o princípio envolvendo esse tipo de vacina consiste na entrega de um gene ou fragmentos de gene contendo informação de antígenos imunogênico*s* para o hospedeiro via plasmídeos de DNA com a intenção de induzir uma resposta imune. Comparando com vacinas tradicionais, as vacinas de DNA apresentam diversas vantagens: o potencial de induzir amplas respostas imunológicas

sem o risco associado à replicação de microrganismos (XU; YUEN; LAM, 2014); estimulação da imunidade celular e humoral; produção eficiente em larga escala, consequência do baixo custo de síntese; estabilidade tanto na produção quanto nos processos de armazenamento; e a possibilidade de construir um vetor que codifica vários antígenos em uma única vacina (BASHIRU; BAHAMAN, 2018). Diversos estudos foram publicados nesse sentido, conforme compilado por SILVEIRA et al., 2017 e BARAZZONE et al., 2021 - submetido para publicação.

Assim como as vacinas de proteínas recombinantes, as vacinas de DNA têm mostrado resultados promissores como estratégia para o controle da leptospirose e ambas abordagens devem ser exploradas a fim de maximizar seu impacto e eficácia contra a leptospirose humana e animal.

1.3. Mecanismos de patogenicidade

Devido a abordagens moleculares modernas, foi produzida uma grande quantidade de dados e várias proteínas identificadas foram descritas por serem potenciais fatores de virulência, por meio de ensaios *in vitro*, e validação de fenômenos biológicos utilizando-se de ferramentas genéticas para criação de mutantes *knock down* (silenciamento gênico na estirpe patogênica), *knock out* (inativação gênica) ou *knock in* (inserção gênica na estirpe saprofítica).

O sucesso de um patógeno em estabelecer a infecção depende de sua rápida disseminação pelos tecidos do hospedeiro e colonização dos órgãos-alvo, que são locais imunologicamente privilegiados. Após a penetração das leptospiras no tecido, a colonização se da via interação das bactérias com os componentes da matriz extracelular e células do hospedeiro. OZURU et al., (2017) demonstraram que tecidos adiposos são os primeiros locais de colonização das leptospiras após infecção.

Muitos estudos com foco na relação de aderência das leptospiras tem sido feitos, mostrando que *Leptospira* spp. são capazes de se aderir a componentes da matriz extracelular, como colágeno I, colágeno IV, laminina e fribronectina (ATZINGEN et al., 2008; BARBOSA et al., 2006). Diversas proteínas já foram descritas com comportamento de adesinas (CAVENAGUE et al., 2019; FERNANDES et al., 2016; KOCHI et al., 2019; PASSALIA et al., 2020, 2021; TEIXEIRA et al., 2015, DAROZ et al., 2021 - submetido para publicação).

A interação das leptospiras com células endoteliais e células epiteliais dos

túbulos renais pode ter grande impacto na disseminação e persistência das bactérias no organismo. Diversos estudos foram feitos nesse sentido e mostraram a adesão com as microvilosidades dessa células (DE MARTINO et al., 1969; MARSHALL, 1974; MILLER; WILSON, 1967; STERLING; THIERMANN, 1981). Comparações de aderência entre estirpes virulenta e saprofítica foi realizada com células renais do tipo MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) e L929 foram demonstradas por microscopia, sugerindo, então, que as estirpes virulentas apresentam mais aderência do que as saprofíticas. (BALLARD et al., 1986; ITO; YANAGAWA, 1987; TSUCHIMOTO et al., 1984; VINH; FAINE; ADLER, 1984).

As caderinas são um componente responsável por manter a integridade do tecido endotelial, por proporcionar uma adesão célula-célula. Estudos *in vitro* mostram que a *L. interrogans* é capaz de se ligar a e-caderina, podendo resultar em dano vascular, facilitando a disseminação do patógeno da corrente sanguínea para diferentes tecidos durante a infecção, e pode contribuir para as manifestações hemorrágicas da leptospirose (EVANGELISTA et al., 2014; SATO; COBURN, 2017).

Meri et al., (2005) reportou pela primeira vez a evasão de leptospiras do sistema complemento. Foi demonstrado que as estirpes de *Leptospira* resistentes ao soro se ligam ao Fator H, permanecendo funcionalmente ativo e atuando como cofator na clivagem de C3b pelo Fator I. As leptospiras também apresentam capacidade de ligação ao C4bp (C4 *binding protein*), um componente inibidor da via clássica e das lectinas do complemento. Essa interação, juntamente com o fato de C4bp não perder sua capacidade de cofator, permite que haja a clivagem de C4 mediada pelo Fator I, indicando uma resistência das bactérias ao soro humano (BARBOSA et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2015).

Toma et al., (2011) demonstraram que a *L. interrogans* tem a capacidade de sobreviver, replicar e escapar de macrófagos de camundongos, possibilitando a disseminação para órgãos alvos. As bactérias fagocitadas por macrófagos humanos apresentam a capacidade de escapar de fagossomos para o citosol (SHIJUN LI et al., 2010), onde elas conseguem proliferar e ativar a apoptose celular, por meio da proteína de superfície Loa22 (WU et al., 2011), já descrita como um fator de virulência (RISTOW et al., 2007). As proteínas de superfície Mce (*mammalian cell entry*) e LMB2016 também atuam na adesão das leptospiras a macrófagos e subsequente invasão (TOMA et al., 2014; ZHANG et al., 2012).

A *Leptospira* patogênica tem a capacidade de capturar o fibrinogênio humano

e reduzir sua disponibilidade para a trombina *in vitro*, levando a uma menor formação do coágulo de fibrina (OLIVEIRA et al., 2013), o que pode permitir uma maior disseminação das bactérias na fase inicial da leptospirose. A formação do coágulo de fibrina tem um papel chave na inibição da disseminação dos patógenos (RIVERA et al., 2007). Já foram descritas varias proteínas com capacidade de inibição do fibrinogénio humano e inibição da formação do coagulo de fibrina (LIN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2016).

As leptospiras também apresentam a capacidade de capturar plasminogênio circulante no plasma (VIEIRA et al., 2009), através de receptores proteicos expostos na superfície da bactéria (VIEIRA; NASCIMENTO, 2016). Essa captura permite a ativação do plasminogênio em plasmina, sua forma enzimaticamente ativa, utilizando os próprios ativadores do hospedeiro. Com as leptospiras munidas de plasmina em sua superfície, essas são capazes de degradar componentes da matriz extracelular, como lamina e fibronectina plasmática, potencializando a capacidade de disseminação das leptospiras. Além disso, essas leptospiras “cobertas” de plasmina também pode interferir na deposição de C3b e IgG *in vitro*, provavelmente por meio da degradação desses componentes, consequentemente diminuindo o processo de opsonofagocitose, contribuindo para a evasão imune da bactéria (VIEIRA et al., 2011). O mesmo mecanismo de disseminação também foi descrito em *Borrelia* spp. (COLEMAN et al., 1995); porém, esta espiroqueta também é munida de uma atividade proteolítica endógena conferida por uma proteína exposta do tipo *High Temperature Requirement* A (HtrA) que é capaz de degradar diversos componentes da matriz extracelular, como fibronectina, e-caderina e proteoglicanos (RUSSELL; DELOREY; JOHNSON, 2013).

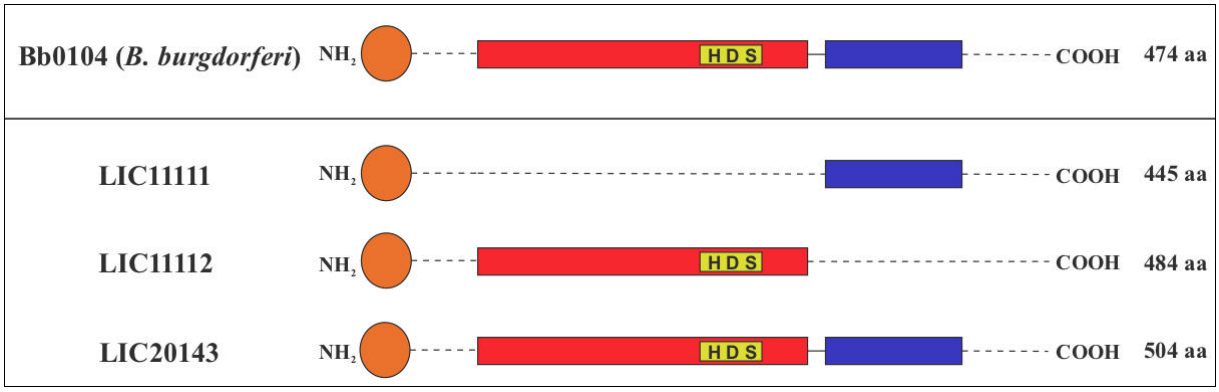
1.4. *High Temperature Requirement* A (HtrA)

Proteínas da família de HtrA podem ser encontradas em vários tipos celulares, desde procariotos a primatas. Elas são um conjunto de proteases, geralmente transportadas para o periplasma, onde formam oligômeros proteoliticamente ativos que desempenham importante função no controle da qualidade proteico (GOTTESMAN, 1996; INGMER; BRØNDSTED, 2009).

Três proteínas homólogas da família HtrA (DegP, DegQ e DegS) foram descritas em *E. coli,* apresentando a função das HtrA em bactérias Gram-negativas

(WALLER; SAUER, 1996). Essas proteínas, normalmente, possuem um domínio catalítico de serino-protease semelhante a tripsina, onde possuem uma tríade catalítica composta pelos aminoácidos histidina, ácido aspártico e serina (His-Asp-Ser), próximo ao N-terminal e um ou dois domínios PDZ (*post synaptic density* de 95 kDa, *discs large*, and Zonula Occludens 1) no C-terminal, responsável pelo reconhecimento e interação proteína-proteína, assim como no processo de oligomerização (**Figura 9**) (BACKERT et al., 2018; CLAUSEN et al., 2011; PALLEN; WREN, 1997; ZARZECKA et al., 2021).

Figura 9 - Arquitetura dos domínios de proteínas da família HtrA



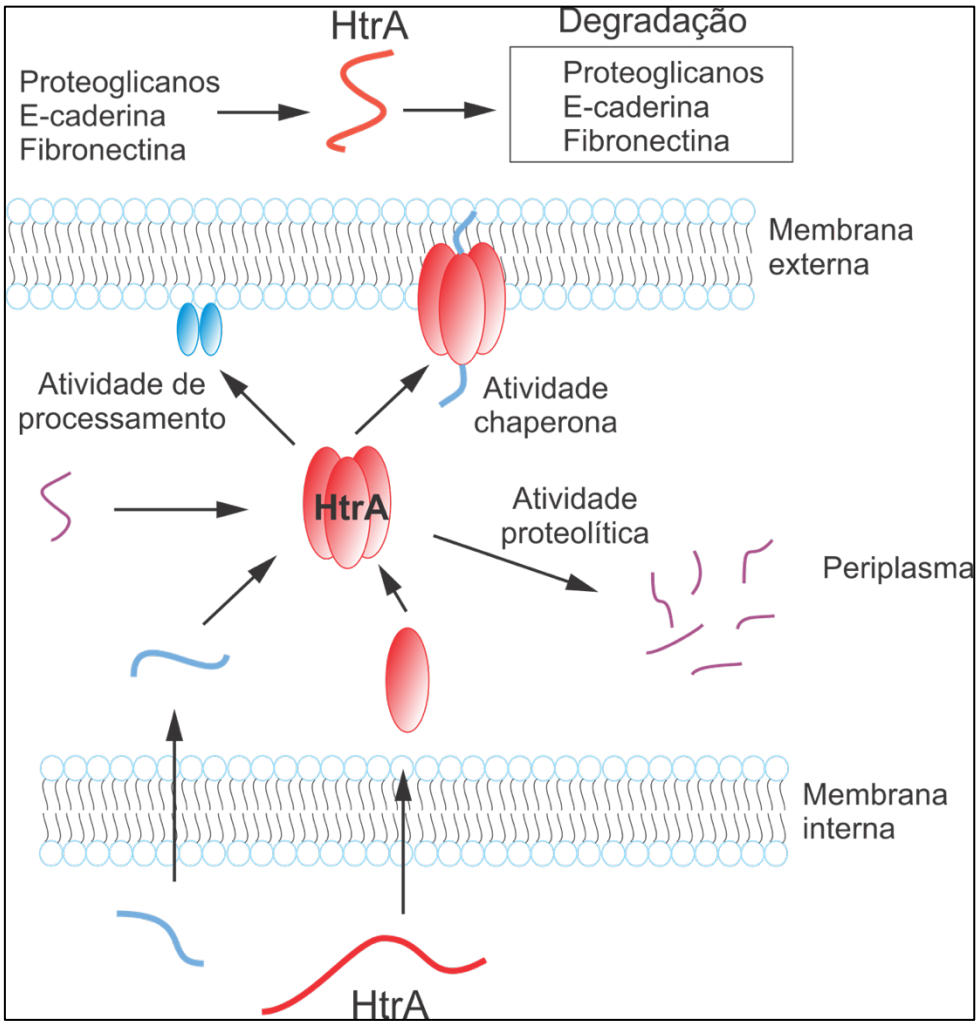
Representação esquemática da organização do domínio das proteínas codificadas pelos genes da LIC11111, LIC11112 e LIC20143. HtrA de *B. burgdorferi* (Bb0104) foi usada como referência mostrando o peptídeo sinal, serino-protease e domínio PDZ, comuns a esta família de proteínas. As regiões em vermelho representam o domínio da serino-protease, em azul o domínio PDZ e em laranja a região do peptídeo sinal. A tríade catalítica (histidina, aspartato e serina; HDS) está no quadro amarelo.
Fonte: Adaptado de Daroz, et al. (2020).

As HtrAs bacterianas apresentam uma função de controle de qualidade celular, onde são responsáveis pela remoção de proteínas enoveladas inadequadamente; essas proteínas normalmente estão presentes em condições adversas, como pH extremo, temperatura elevada e aumento de estresse oxidativo ou osmótico (CLAUSEN; SOUTHAN; EHRMANN, 2002; FREES; BRØNDSTED; INGMER, 2013; HANSEN; HILGENFELD, 2013; KIM; KIM, 2005; KROJER et al., 2008; SKORKO-GLONEK et al., 2012).

Durante muito tempo acreditou-se que as proteases do tipo HtrA eram exclusivamente funcionais dentro do periplasma bacteriano (HARRER et al., 2017). No entanto, além de seu papel de controle de qualidade, foram identificadas proteínas do tipo HtrA secretadas, que podem contribuir diretamente para a patogênese

bacteriana; estas proteínas podem ser ativamente secretadas para o ambiente extracelular, onde elas são capazes de clivar componentes da célula hospedeira. Esse papel funcional já foi descrito para várias bactérias como: *Campylobacter jejuni* (BOEHM et al., 2012, 2013), *Helicobacter pylori* (HOY et al., 2010; LÖWER et al., 2008; SCHMIDT et al., 2016; TEGTMEYER et al., 2017), *Yersinia enterocolitica* (ABFALTER et al., 2016), *Salmonella enterica* (ABFALTER et al., 2016; HOY et al., 2012) (**Figura *10***).

Figura 10 - Atividades descritas pela HtrA



Fonte: Adaptado de Gherardini (2013).

Borrelia burgdorferi é uma bactéria espiroqueta e agente etiológico da doença de *Lyme*. Essa bactéria possui uma HtrA (HtrABb) já estudada por diversos laboratórios, onde foi demonstrada diversas funções proteolíticas: degradação dos componentes da matriz extracelular (ECM), como fibronectina, e-caderina e

proteoglicanos (RUSSELL; DELOREY; JOHNSON, 2013; RUSSELL; JOHNSON, 2013); e funções de chaperonas: degradação seletiva de várias proteínas endógenas (COLEMAN; TOLEDO; BENACH, 2018; KARIU et al., 2013).

A bactéria *L. interrogans* possui 5 genes anotados como codificadores de possíveis proteínas do tipo HtrA: LIC11111, LIC11112 e LIC11037, sendo esses três pertencentes ao cromossomo I que possui 4,277,185 bp, e LIC20143 e LIC20144 pertencentes ao cromossomo II, com 350,181 pb. Dentre estes, as proteínas codificadas pelos genes LIC11111 e LIC11037 estão anotadas como proteínas do tipo HtrA2, possuindo apenas o domínio PDZ, ao passo que a proteína codificada pelo gene LIC11112 esta anotada como serino-protease, possuindo apenas o sítio catalítico serino-protease. O fato dos genes LIC11111 e LIC11112 estarem organizados em um *operon* por análises *in silico* (LIC11110-LIC11113) pode indicar que as duas proteínas sejam co-expressas e possam interagir para compor um heterodímero HtrA funcional. A proteína codificada pelo gene LIC20143 também está anotada como serino-protease, porém ela apresenta ambos o domínio de serino-protease e um domínio PDZ. Ademais, a presença de genes homólogos na estirpe saprofítica *L. biflexa* também sugere um possível papel *housekeeping.*

Um passo fundamental para entendimento da biologia básica e fatores de virulência de microrganismos é a habilidade de gerar mutações genéticas para se avaliar o fenótipo resultante (KAMENI et al., 2002; PICARDEAU; REN; SAINT GIRONS, 2001). A estirpe saprofítica *L. biflexa* pode ser considerada um modelo interessante para a análise de função de proteínas heterólogas, uma vez que essa estirpe não possui várias proteínas envolvidas no processo de infecção por estirpes patogênicas (PICARDEAU et al., 2008)**.** Proteínas de superfície com atividades de ligação *in vitro* foram validades por meio da construção de *L. biflexa* recombinante. Figueira et al., (2011) mostraram que a expressão heteróloga dos genes *ligA* e *ligB* em *L. biflexa* confere adesão aumentada a células cultivadas e a fibronectina; *L. biflexa* expressando a proteína Mce (*mammalian cell entry*) ganhou a capacidade de infectar macrófagos, mostrando a importância desta proteína particular na patogênese da leptospirose (ZHANG et al., 2012). A proteína de superfície LMB216 também mostrou estar envolvida na ligação a macrófagos pela mesma metodologia (TOMA et al., 2014).

A geração de mutantes de ganho função pelas ferramentas supramencionadas e a consequente caracterização da função das proteínas do tipo HtrA em *Leptospira*

spp. poderão contribuir para o entendimento da patogênese das leptospiras, especialmente no que tange a seu elevado potencial de invasividade e capacidade de adaptação a diferentes nichos.

Neste contexto, os genes da LIC11111, LIC11112 e LIC20143 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni foram selecionados como intuito de caracterizar o papel funcionar delas na patogenicidade da bactéria, tanto pelo método de proteína recombinante, como pela geração de mutantes de ganho de função.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O projeto tem como objetivo caracterizar o papel das proteínas do tipo HtrA de *Leptospira interrogans*, LIC11111, LIC11112 e LIC20143, por meio da obtenção de proteínas recombinantes e obtenção de mutantes da bactéria *Leptospira biflexa* para avaliar ganho de função.

2.2. Objetivos específicos

- Clonar os genes da LIC11111, LIC11112 e LIC20143 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, expressar e purificar as respectivas proteínas recombinantes utilizando *E. coli* como sistema hospedeiro de expressão;
- Caracterizar a estrutura das proteínas purificadas;
- Avaliar a conservação das proteínas nativas estudadas em diferentes espécies de *Leptospira*;
- Avaliar a reatividade das proteínas recombinantes frente a soros de pacientes diagnosticados com leptospirose;
- Estudar a localização das proteínas na *L. interrogans*;
- Avaliar a interação das proteínas recombinantes com componentes da matriz extracelular e plasma do hospedeiro, assim como a caracterização dessas ligações;

- Obtenção de *L. biflexa* sorovar Patoc recombinante superexpressando as proteínas estudadas.

3. METODOLOGIA

3.1. Estirpes e soros utilizados

A bactéria *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe M20 (patogênica, atenuada em cultura), *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe FIOCRUZ L1-130 (virulenta, recém-isolada de animal), *L. kirschnerii* sorovar Grippotyphosa, *L. santarosai* sorovar Shermani, *L. borgpetersenii* sorovar Whitcomb, *L. noguchii* sorovar Panama (patogênicas) e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc1 (saprofítica) foram utilizadas neste trabalho. As estirpes de leptospiras são rotineiramente mantidas na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMV USP), em meio EMJH líquido (TURNER, 1970) contendo 10% EMJH *enrichment* (Difco).

Foram utilizadas as linhagens DH5α de *E. coli* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, EUA), *E. coli* π1, uma estirpe auxotrófica derivada de DH5α que necessita de dT (timidina) no meio de cultura para crescimento (DEMARRE et al., 2005) e *E. coli* β2163, uma estirpe auxotrófica que necessita de DAP (diaminopimelato) no meio de cultura para crescimento (PICARDEAU, 2008) para as etapas de clonagem e seis linhagens de *E. coli* para os ensaios de expressão das proteínas recombinantes: BL21 SI (Salt Induced) (Invitrogen), que possui o gene da T7 RNA polimerase integrado ao genoma sob controle do promotor proU indutível por NaCl (BHANDARI; GOWRISHANKAR, 1997); BL21 (DE3) (Invitrogen) que também possui o gene da T7 RNA polimerase, mas dirigida pelo promotor *lac*UV5, o qual é induzido por IPTG (isopropil-B-D-tiogalactopiranosídio) (STUDIER et al., 1990); BL21 Star (DE3)pLysS (Invitrogen), a qual possui um plasmídeo pLysS que expressa uma enzima (T7 lisozima) que degrada a polimerase T7, impedindo a expressão basal na ausência do indutor, além de possuir o gene *rne* (*rne*131) mutado, produzindo uma RNase E inoperante, o que aumenta a estabilidade do mRNA nestas estirpes (INVITROGEN, 2018); C43 (DE3) (Lucigen Corporation, Middleton, Wisconsin, EUA) é uma estirpe derivada da BL21 (DE3) que contém mutações genéticas selecionadas fenotipicamente por conferir tolerância a proteínas tóxicas, por ser uma estirpe

derivada, também possui o gene da T7 RNA polimerase dirigida pelo promotor *lac*UV5 e induzido por IPTG; Rosetta (DE3) (Novagen®, Darmstadt, Alemanha) é um estirpe derivada da BL21 engenheirada para aumentar a expressão de proteínas eucarióticas que contêm códons raramente usados em *E. coli* (tRNAs para codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) (NOVAGEN, 2018); BL21 (DE3)pGro7 (Takara Bio, Inc, Otsu, Shiga, Japão) que possui um plasmídeo capaz de expressar duas chaperonas (groES e groEL) a fim de facilitar o dobramento da proteína recombinante de interesse.

3.2. Análises de bioinformática

Os genes selecionados de *L. interrogans* sorovar Copenhageni encontram-se disponíveis no site http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/ (NASCIMENTO et al., 2004b, 2004a). Foram feitas análises para determinar a localização celular destas proteínas com o auxílio do programa CELLO http://cello.life.nctu.edu.tw/ (YU; LIN; HWANG, 2004). Ademais, foi feita análise para determinar possíveis sítios de clivagem e lipidação nas sequências pelo programa LipoP http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/ (JUNCKER et al., 2003).

A presença de domínios conservados foi analisada com o auxílio do programa SMART http://smart.embl-heidelberg.de/. O software BLAST https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi foi utilizado para analisar a similaridade das sequências de aminoácidos com outras espécies e sorovares de *Leptospira* disponíveis no banco de dados. Após a análise de similaridade, o programa CLUSTAL OMEGA https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/ auxiliou o alinhamento múltiplo destas sequências.

O software PROTPARAM https://web.expasy.org/protparam/ foi utilizado para as análises de ponto isoelétrico (PI) e massa molecular das proteínas recombinantes.

Para investigar a posição da tríade catalítica e das regiões PDZ na estrutura das proteínas codificadas pelos genes da LIC11111, LIC11112 e LIC20143, a estrutura 3D dessas proteínas foi modelada submetendo as sequências lineares ao software online I-TASSER (ZHANG, 2008). O I-TASSER gerou um total de cinco modelos de cada proteína alvo. Os modelos com a melhor pontuação de confiança e pontuação Z foram escolhidos e, em seguida, visualizados usando o sistema de gráficos moleculares PyMOL (Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) para as sequências. Foi realizado um

aumento na região de serino-protease mostrando as posições previstas para os três aminoácidos da tríade catalítica (His-Asp-Ser).

Com o objetivo de investigar os aminoácidos conservados no domínio da serino-protease presentes no LIC20143 e LIC11112, um alinhamento foi realizado usando o programa de alinhamento PROMALS3D (PEI; GRISHIN, 2014).

.

3.3. Preparação do DNA genômico

Leptospiras foram coletadas do meio de cultura EMJH após serem crescidas por aproximadamente 7 dias (JOHNSON; HARRIS, 1967). O sedimento celular foi ressuspendido em 467 µL de tampão Tris-EDTA (TE) e adicionado 30 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 3 µL de proteinase K a 20 mg/mL. A mistura foi homogeneizada e incubada por 1 hora a 37 °C, sendo adicionados 500 µL de fenol-clorofórmio 1:1 (v/v) nas soluções. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 24.104 x g. A fase superior formada após a centrifugação foi transferida para um novo microtubo e então a etapa de fenol-clorofórmio foi repetida. Na fase superior recuperada foram adicionados 50 µL de acetato de sódio 3 M e 300 µL de isopropanol gelado e a mistura foi mantida por 1 hora a - 20 °C. Após a incubação, a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 14.881 x g a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado com 1 mL de etanol 70% por 5 minutos. Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições anteriores e o etanol foi desprezado. O material genético foi ressuspendido em 50 µL de água estéril e a concentração foi determinada por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm.

3.4. Clonagem

Para obtenção dos fragmentos dos genes LIC11111 e LIC11112 foram realizadas reações de PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe M20. A LIC20143 já havia sido trabalhada pelo nosso grupo, portanto o gene já estava clonado no vetor pAE, sendo este utilizado para expressão da proteína.

Os insertos foram amplificados excluindo-se a sequência de nucleotídeos que

codificam o peptídeo sinal e foram adicionados os sítios de restrição aos oligonucleotídeos conforme descrito no Quadro 1. Os sítios de restrição foram escolhidos de maneira que não estivessem presentes na sequência alvo a ser clonada, a fim de garantir a integridade do inserto.

A especificidade e o tamanho das sequências de interesse foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA) corado com Gel Red™ (Biotium, Inc, Hayward, California, EUA). Os insertos de interesse foram purificados diretamente da reação de PCR de acordo com o kit "GFxPCR DNA and gel band purification" (GE Healthcare, Buckinghshire, Reino Unido) e os produtos obtidos foram quantificados em espectrofotômetro.

Quadro 1 – Sequência de oligonucleotídeos empregada para amplificação do gene da LIC11111 e da LIC11112 para diversos os vetores de expressão pAE e pET-SUMO (*small uniquitin-like modifier*)

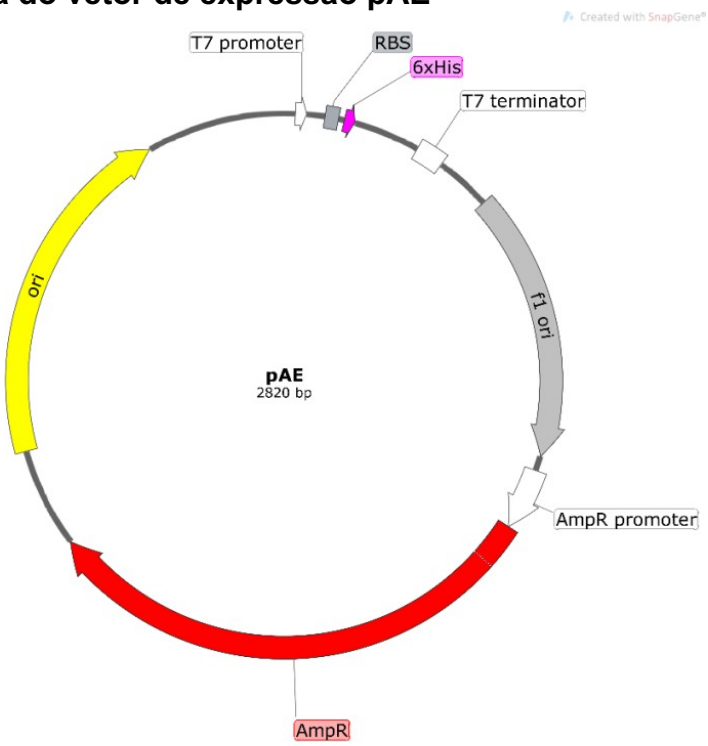
Vetores de expressão	Gene ID	Sequência de oligonucleotídeos
pAE	LIC11111	F: ATGC**CTCGAG**GAAACGATTCTGGTTCACTTTAG (***Xho*I**) R: ATGCAAGCTTTCAATGTAAATTGTCTAATTTATCC (***Hind*III)**
	LIC11112	F: ATGC**CTCGAG**AATACCGCGGATCTAAAAGTTC (***Xho*I**) R: ATCG**AAGCTT**TCATTCGTCCGCCTCCACGTCGAAG (***Hind*III**)
pET-SUMO	LIC11111	F: ATGC**GAATTC**GAAACGATTCTGGTTCACTTTAG (***Eco*RI)** R: ATGC**CTCGAG**TCAATGTAAATTGTCTAATTTATCC (***Xho*I**)
	LIC11112	F: ATGC**GAATTC**AATACCGCGGATCTAAAAGTTC (***Eco*RI**) R: ATGC**CTCGAG**TCATTCGTCCGCCTCCACGTCGAAG (***Xho*I**)

Notas: Sequência em negrito refere-se aos sítios de restrição utilizados. F – *forward*. R – *reverse.* SUMO - *small ubiquitin-like modifier.*

3.4.1. Clonagem no vetor de expressão pAE

O vetor de expressão pAE (**Figura *11***) (RAMOS et al., 2004) foi desenvolvido para expressar a proteína recombinante contendo seis resíduos de histidina na região N-terminal, sendo um sistema de alta expressão que é controlado pelo promotor do fago T7; dessa maneira, a expressão da proteína recombinante só ocorre na presença da T7 RNA polimerase.

Figura 11 – Mapa do vetor de expressão pAE

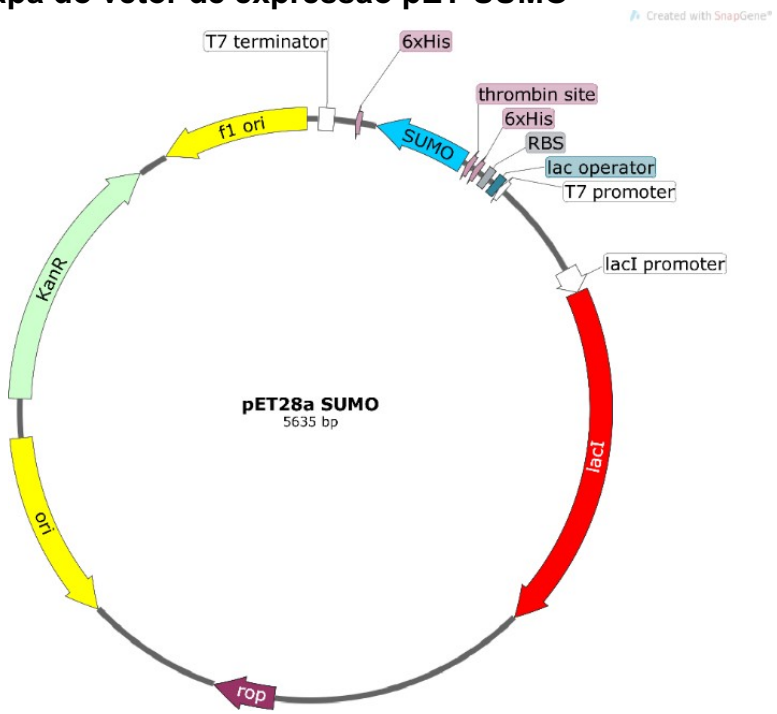


T7 Promoter: promotor. 6xHis: sequência codificadora para seis resíduos de histidina. RBS: sítio de ligação ao ribossomo. T7 Terminator: região de terminação de transcrição. AmpR promoter: promotor para o gene de resistência a ampicilina. AmpR: gene de resistência a ampicilina. Ori: origem da replicação.
Fonte: Adaptado de Ramos (2004). Imagem gerada pelo software SnapGene.

3.4.2. Clonagem no vetor de expressão pET-SUMO

O vetor pET28a-SUMO possui um *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) (**Figura *12***) que tem a capacidade de aumentar a solubilidade de proteínas recombinantes parcialmente insolúveis, por ser expresso fusionado a proteína de interesse. A sua estrutura terciária é reconhecida e clivada de maneira específica pela SUMO protease (ULP1 - *Ubiquitin-like-specific protease* 1), deixando ao fim do processo a proteína recombinante na sua forma nativa (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

Figura 12 – Mapa do vetor de expressão pET-SUMO



T7 Promoter: promotor. 6xHis: sequência codificadora para seis resíduos de histidina. RBS: sítio de ligação ao ribossomo. T7 Terminator: região de terminação de transcrição. SUMO: região codificadora da proteína *small ubiquitin-like modifier* (ThermoFisher Scientific). Imagem gerada pelo software SnapGene.

Após a confirmação de que os insertos foram amplificados da maneira esperada, estes e seus vetores de expressão correspondentes foram submetidos a uma reação de digestão utilizando as respectivas enzimas de restrição (Quadro 1), os oligonucleotídeos foram desenhados de maneira que houvesse uma sequência sobressalente para que o ensaio de digestão fosse eficaz para ligação aos vetores de expressão. A reação foi feita com o tampão indicado pelo fabricante para cada combinação de enzimas.

A reação de ligação foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (T4 DNA Ligase Buffer, Invitrogen™). Os produtos de ligação foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* DH5α previamente tornadas competentes pelo método descrito por (HANAHAN, 1983).

3.5. Transformação de bactérias *E. coli*

Para a transformação foram utilizados 15 µL do produto de ligação e 50 µL de bactérias competentes, que foram retiradas do -80 ºC e descongeladas em gelo.

Incubou-se por 30 minutos em banho de gelo e depois a amostra foi submetida a um choque térmico, por 2 minutos a 42 ºC. Retornou-se ao banho de gelo por mais 5 minutos e acrescentaram-se 350 µL de meio de cultura Luria Bertani – LB (0,5% extrato de levedura; 1% triptona; 1% NaCl). Incubou-se a 37 ºC, por 1 hora, sob agitação. A amostra foi plaqueada em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina para o vetor pAE e 100 µg/mL de canamicina para o vetor pET-SUMO. Incubou-se a 37 ºC por uma noite.

Para obtenção do DNA plasmidial dos clones recombinantes utilizou-se o kit "*PlasmidPrep mini spin*" (GE Healthcare) de acordo com as orientações do fabricante. Foi verificada a presença de insertos nos plasmídeos obtidos, por meio de eletroforese em gel de agarose, após a digestão dos mesmos com as enzimas de restrição que reconhecem os sítios contidos nas extremidades 5' dos pares de oligonucleotídeos, ou por PCR de colônia que consiste em selecionar uma colônia da placa e submetê-la a uma reação de PCR utilizando a colônia como molde e os oligonucleotídeos correspondentes ao inserto de interesse para demonstrar que a bactéria foi capaz de incorporar o plasmídeo recombinante.

3.6. Indução da expressão das proteínas recombinantes

Foram utilizadas 6 estirpes de bactérias competentes para expressão das proteínas recombinantes ao longo do estudo: C43 (DE3), BL21 (DE3) pGro7, BL21 (DE3), BL21 Star (DE3)pLysS, BL21 SI e Rosetta (DE3)pLysS. As bactérias competentes BL21 SI (*Salt induced*) foram transformadas com os plasmídeos recombinantes e cultivadas em meio 2YT/ON (1% de extrato de levedura, 1,6% de triptona, sem adição de NaCl), com 100 µg/mL de antibiótpico ampicilina e incubadas a 37 °C com agitação durante a noite. A cultura saturada foi diluída na proporção 1:20 em um novo frasco, onde o crescimento bacteriano foi monitorado por meio de leituras de espectrofotômetro até a densidade ótica (DO) de 600 nm, a qual consiste no início da fase exponencial do crescimento. Depois de atingida essa DO, as estirpes foram induzidas com a adição de 300 mM de NaCl e incubadas por 3 horas a 37 °C.

As estirpes C43 (DE3), BL21 (DE3), BL21 Star (DE3) pLysS e Rosetta (DE3) pLysS foram também transformadas e cultivadas em meio LB, contendo ampicilina a 100 µg/mL e, para as estirpes BL21 Star (DE3) pLysS, BL21 (DE3) pGro7 e Rosetta

(DE3) pLysS, além da ampicilina, foi adicionado cloranfenicol a 34 µg/mL. A indução foi feita com 1 mM de IPTG durante 3 horas a 37 °C, ou por 12 horas a 18 °C. Em seguida as culturas foram centrifugadas por 15 minutos a 3.075 x g a 4 ºC, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em tampão de lise (10 mM Tris pH 8, NaCl 150 mM, lisozima, Triton x-100. As células foram lisadas pelo sonicador em banho de gelo e novamente centrifugadas por 10 minutos a 12.298 x g. Em seguida, o sedimento celular formado foi ressuspendido em tampão desnaturante (10 mM Tris pH 8, NaCl 150 mM, 8M ureia). A LIC20143 já havia sido otimizada a purificação, portanto não foram feitos testes de expressão para essa proteína.

3.7. Purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes LIC11111, LIC11112 e LIC20143 foram purificadas utilizando a técnica de cromatografia de afinidade ao metal. A resina *Chelating Sepharose* (GE Healthcare) foi incubada com Ni^{2+} e, em seguida, foi equilibrada com o tampão contendo 10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl. A proteína recombinante a ser purificada foi obtida a partir de 400 mL de meio, e o sedimento formado após a lise foi mantido em 50 mL de solução de ureia por 12 horas a fim de garantir maior solubilidade dos corpúsculos de inclusão. A solução de proteína e ureia foi gotejada (fluxo de 2 mL/minuto) sob agitação em 2 L de solução tampão *refolding* (10 mM Tris, 150 mM NaCl) e então foi carregada na coluna de sefarose. Quando a proteína foi obtida na forma solúvel, a coluna foi carregada a partir da sobrenadante após a lise celular. Para retirar possíveis contaminantes de proteínas de *E. coli* a coluna foi lavada com soluções contendo baixas concentrações de imidazol (5 mM, 20 mM, 40 mM e 60 mM). A eluição da proteína recombinante foi feita coletando várias alíquotas do *flowthrought* de uma solução a 1 M de imidazol. Todas as amostras foram coletadas e analisadas por gel de SDS-PAGE. As amostras contendo a proteínas recombinantes foram dialisadas em solução 10 mM Tris pH 8, NaCl 150 mM para remover o imidazol da amostra, sendo feitas 3 trocas em um intervalo de 2 horas.

A quantificação das proteínas foi feita por gel SDS-PAGE 12% comparativo. As bandas da proteína recombinante foram analisadas de acordo com as bandas de massas conhecidas de albumina (BSA – *Bovine Serum Albumin*), utilizando o software de análise imagens de eletroforese Gel Quantifier Image Analysis (GelQuant versão

2.7.0) por comparação densitométrica. As imagens foram feitas com o fotodocumentador MINIBis Pro, Uniscience.

3.8. Espectroscopia circular

As amostras foram dialisadas em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4, uma vez que não contem íon cloro o que poderia interferir na leitura das amostras. O espectropolarímetro J-810 (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japão) foi utilizado para as medições em temperatura ambiente. O espectro foi medido utilizando uma célula de 1 mm e expressos em termos de elipticidade molar residual:

$$[\Phi] = \frac{\Phi x 100 x M \frac{g}{mol}}{C \frac{g}{L} x I(cm) x (N-1)}$$

onde Φ é a elipticidade em graus, M é a massa molecular da proteína, C é a concentração da proteína, I é o caminho ótico e N é o número de resíduos de aminoácidos das proteínas.

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

3.9. Imunização

Cinco camundongos BALB/c fêmeas (6 a 8 semanas), foram imunizados com 10 µg de cada proteína recombinante em suspensão com *Alhydrogel* [2% $Al(OH)_3$, (Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca)]. O controle negativo foi obtido coletando o sangue antes da imunização (pré-imune). Foram realizadas três imunizações em intervalos de duas semanas cada. Os animais foram sangrados via plexo retro-orbital duas semanas após cada imunização. Ao fim da terceira sangria, ainda foram realizadas mais duas coletas, totalizando cinco sangrias a fim de determinar a manutenção dos títulos após o término das imunizações. O material coletado foi mantido a 4 °C por 30 minutos, posteriormente a 37 ºC por 30 minutos e

então centrifugado em 3.075 x g por 5 minutos. O soro foi coletado e armazenado a -20 °C.

3.10. Titulação do soro de animais imunizados

A avaliação da presença de anticorpos contra as proteínas recombinantes nos soros de camundongos imunizados com as mesmas foi feita pelo ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*).

As proteínas recombinantes foram diluídas em tampão carbonato 0,05 M pH 9,6 e, em seguida foram adicionados 250 ng por poço em uma placa de 96 poços (ELISA Plate, High Binding F, Sarstedt, Alemanha. Incubou-se a placa a 4 ºC por uma noite. Após incubação, a placa foi lavada com PBS-Tween 0,05% (PBS-T) e então incubada com 200 µL/poço de uma solução de bloqueio (PBS-T contendo 10% de leite desnatado) durante 2 horas a 37 ºC.

Foram feitas diluições seriadas de 1:200 a 1:204.800 dos soros de camundongos em solução de bloqueio acrescida de extrato de *E. coli* (10% v/v). Incubaram-se estes soros por 1 hora para que ocorresse a adsorção dos anticorpos inespecíficos em relação às proteínas recombinantes, ou seja, anticorpos gerados contra contaminantes de *E. coli* que pudessem estar contidos nas alíquotas de proteína recombinante purificada (GRUBER; ZINGALES, 1995). Para cada antígeno foi feito um “branco”, ou seja, não houve incubação com os antissoros para que o sinal inespecífico do anticorpo secundário ao antígeno fosse descontado de cada reação. Em seguida, adicionaram-se 100 µL das amostras adsorvidas por poço da placa na qual as proteínas recombinantes foram imobilizadas e foi feita incubação a 37ºC por 1 hora. Para detecção de anticorpos ligados às recombinantes, foi empregada uma solução de anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase (1:5.000, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, EUA e Complement Technology, INC. Tyler, Texas, EUA)

A reação enzimática foi revelada pela adição de 100 µL de uma solução contendo 1 mg/mL de OPD (δ-phenylenediamina, Sigma-Aldrich) diluído em tampão fosfato-citrato pH 5 contendo 1 µL/mL de peróxido de hidrogênio. Após 15 minutos de incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de solução de H_2SO_4 4N. A intensidade da reação foi medida por espectrofotômetro, no comprimento

de onda de 492 nm. O título individual foi determinado como sendo o inverso da maior diluição do soro com valor da DO492 nm maior do que 0,1.

3.11. Detecção de anticorpos IgG em soros de humanos diagnosticados com leptospirose

A detecção de anticorpos humanos IgG anti-rLIC11111, anti-rLIC11112 e anti-rLIC20143 foi realizada imobilizando 250 ng de proteína recombinante por poço em placa de ELISA e incubando a 4 ºC por 16 horas. Após lavagem e bloqueio, foram adicionados soros pareados de pacientes diagnosticados com leptospirose (n=20 MAT-: fase inicial e n=20 MAT+: fase convalescente), previamente adsorvidos em 10% extrato de *E. coli.* Após 2 horas de incubação a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e então incubada por 1 hora com solução contendo anticorpo anti-IgG humano conjugado à peroxidase na diluição 1:5.000 (Sigma-Aldrich). Então, a placa foi lavada e a reatividade revelada conforme acima descrito, utilizando-se o substrato OPD.

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

3.12. Imunoblotting

As proteínas a serem avaliados foram separadas por SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose “Hybond-ECL” (GE Healthcare) em sistema semi-úmido (GE) por 1 hora a 0,8 mA por cm^2 em Tris-Glicina acrescido de 1,85% de SDS (tampão de transferência). Para confirmar a eficácia da transferência, a membrana foi corada com Ponceau S (Sigma). Para remoção do corante a membrana foi lavada com PBS-T e em seguida incubada com solução de bloqueio (PBS-T-leite desnatado 10%) e mantido a 4ºC por uma noite. A membrana foi lavada com PBS-T e incubada com os anticorpos de interesse de acordo com o experimento.

Após a incubação, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com PBS-T. A reatividade foi detectada utilizando-se o kit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate.

3.13. Extração de RNA e transcrição reversa (RT-PCR)

Para extração do RNA total foram utilizados 20 mL de cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpes M20 e L1-130. Após 5 dias de cultivo, as leptospiras foram recuperadas do meio de cultura (4.427 x g, 15 minutos) e ressuspendidas em 2 mL de Trizol (Invitrogen) e então 400 µL de clorofórmio foram adicionados. Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e deixados em repouso por 3 minutos à temperatura ambiente e então foram centrifugados em 17.709 x g a 4 ºC por 15 minutos. As fases aquosas foram transferidas para novos microtubos e foi adicionado 1 mL de isopropanol gelado. Os tubos foram invertidos 6 vezes e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente, e centrifugados novamente por 10 minutos a 17.709 x g a 4 ºC. O precipitado formado foi ressuspendido em 1 mL de etanol 75% gelado. A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada por 5 minutos a 17.709 x g. O precipitado foi seco em papel absorvente por 10 minutos e ressuspendido em 40 µL de água livre de RNase (DEPC – Invitrogen).

Os RNAs totais obtidos foram quantificados por espectrometria a 260 e 280 nm. A relação das duas absorbâncias (A260/280) foi utilizada para avaliar a sua pureza. Dois microgramas de cada RNA foram tratados com a enzima DNase I utilizando o kit DNase Amplification Grade (Invitrogen). As amostras finalmente foram aquecidas por 10 minutos a 65 ºC e divididas em duas frações para realização da reação de transcrição reversa.

Para obtenção da população de cDNA total, utilizou-se o o *kit* comercial SuperScript III (ThermoFisher Scientific). Em cada uma das amostras foram adicionados 25 ng de hexameros randômicos e 1 mM de dNTPs. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65 ºC e então a 1 minuto a 4 ºC. Em seguida foram adicionados em cada uma das frações das amostras 5 mM MgCl2, 10 mM DTT, 40 U de RNase OUT, 200 U SuperScript III RT e tampão fornecido pelo próprio kit, para um volume final de 22 µL (RT+). Nas outras frações das amostras foi adicionado água no lugar da SuperScript III RT, sendo utilizadas como controles de contaminação

genômica (RT-). Todas as amostras foram incubadas em termociclador por 10 minutos a 25 ºC, 50 minutos a 50 ºC,5 minutos a 85 ºC e 5 minutos a 4 ºC. As amostras foram tratadas com 1 U de RNase H por 30 minutos a 37 °C e armazenadas a -20 ºC.

3.14. Real time RT-PCR (RT-qPCR)

A RT-qPCR foi realizada no aparelho CFX96™ Real-Time System (BioRad Laboratories, California, EUA) utilizando o corante SYBR Green I para detectar a formação dos produtos da reação. Como SYBR Green I se liga a qualquer DNA dupla-fita, inclusive aos produtos não específicos da reação, foram realizadas padronizações nas concentrações de oligonucleotídeos e cDNAs para a detecção de um resultado mais confiável.

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). Os oligonucleotideos foram desenhados pelo programa Primer3 (https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) (KORESSAAR; REMM, 2007; UNTERGASSER et al., 2012), tendo como base o genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Quadro 2). Para encontrar a concentração ótima de cada par, foi realizada uma reação de qPCR utilizando 50 ng de DNA genômico da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M20) e três concentrações distintas de cada oligonucleotídeo (400, 300, 150 e 50 nM), como recomendado. De acordo com os resultados obtidos foi determinado que a concentração dos três pares de oligonucleotídeos utilizada é de 400 nM.

Quadro 2 - Sequências de oligonucleotídeos sintetizados para avaliação da expressão gênica

Gene ID	Sequência de oligonucleotídeos	Amplicon (pb)
16S	F: 5' GGTGCAAGCGTTGTTCGG R: 5' GATATCTACGCATTTCACCGC	168
LIC11111	F: 5' ATAATCCCATCGTCCATCCA R: 5' GTGAAAATTTCGCCGTTGAT	181
LIC11112	F: 5' GAAAAGCGATCCGTGTCAAT R: 5' GGAAACGGAAAACCGTGATA	196
LIC20143	F: ACGGACAACCAATTGGAAAA R: CTCCCGCGTGTTTGTTATCT	93

Notas: Gene ID: Identificação do gene no genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Abreviaturas (em inglês): F – *forward*. R – *reverse*. Pb – pares de base.

A padronização da quantidade de cDNA garante que os resultados obtidos estejam dentro de uma faixa linear, ou seja, mesmo alvos com baixos níveis de expressão possam ser detectados. Essa padronização foi feita por meio de curvas padrão, que permitem também calcular a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos, necessária para a validação do método de quantificação relativa C_T compatativo ($\Delta\Delta C_T$). Foram feitas diluições de 4 ou 5 logs utilizando cDNA da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M20).

Dessa forma, cada reação foi preparada em volume de 25 µL empregando 25 ng de cDNA, 400 nM de cada oligonucletídeo (F e R) e 12,5 µL de SYBR® Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) conforme recomendado pelo fabricante. Todas as reações foram realizadas em triplicata em placas óticas de 96 poços. Controle negativo utilizando todos os reagentes exceto o cDNA foi realizado em pararelo a fim de excluir uma possível contaminação (NTC – *non template control*). As seguintes condições térmicas foram aplicadas: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 1 minuto, e 40 ciclos de: i) 95 °C por 15 segundos, ii) 60 °C por 30 segundos. Curva de dissociação foi obtida após para reação por meio de aquecimento dos produtos de PCR a 60 ºC e 95 °C, a fim de garantir a especificidade dos produtos da reação.

3.15. Componentes biológicos

As biomoléculas utilizadas para os ensaios de adesão foram adquiridas em diferentes empresas. Laminina-1 e colágeno tipo IV são derivados do sarcoma murino da membrana basal Engelbreth-Holm-Smarm; fibronectina celular é derivada de fibroblastos humanos; elastina é derivada do pulmão de camundongo; fibronectina plasmática e colágeno I foram isolados da cauda de rato; vitronectina e trombina foram purificadas do plasma humano e todos esses componentes são oriundos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA), incluindo heparan sulfato, heparina, sulfato de condroítina 4 e sulfato de condroítina (glicosaminoglicanos), fibrinogênio humano, fetuína, e-caderina e BSA. Plasminogênio purificado de plasma humano e fator H foram comprados da EMD Chemicals (San Diego, California, EUA). O componente do sistema complemento C4bp foi obtido da Complement Technology (Tyler, Texas, EUA).

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

Os componentes mencionados na sessão anterior (3.15) foram diluídos em PBS (10 µg/mL) e a cada poço de uma placa de ELISA foi adicionado 1 µg dos mesmos, os quais foram incubados por 16 horas a 4 °C para imobilização. Após esse período, as placas foram lavadas e então foram bloqueadas com PBS-T acrescido de 10% de leite desnatado; as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 2 horas. A solução de bloqueio foi descartada, as placas lavadas com PBS-T e a cada poço foi adicionado 1 µg de cada proteína recombinante em 100 µl de PBS. A interação entre o componente e a proteína foi estendida por 2 horas a 37 °C e então as placas foram lavadas seis vezes tendo a detecção das proteínas recombinantes ligadas sido feita pela adição de anticorpo monoclonal anti-His conjugado com peroxidase, empregada em uma diluição que apresentou OD492 nm igual a 1 nos experimentos de titulação, em 100 µl de PBS; a incubação procedeu-se por 1 hora a 37 °C, sendo a reação revelada com substrato OPD conforme descrito anteriormente.

Para as análises estatísticas, a média dos valores de absorbância de cada componente foi comparada com as médias apresentadas pelos controles negativos,

pelo teste t-Student, e um p-valor abaixo de 0,05 (5%) foi considerado estatisticamente significativo. O p-valor apresentado nos resultados se refere ao controle negativo BSA.

3.17. Curva de dose resposta da ligação das proteínas recombinantes aos componentes

Para os componentes aos quais foi verificada uma interação significativa com as proteínas recombinantes, foi realizada uma curva de dose-resposta, a fim de se caracterizar a ligação. Dessa maneira, cada componente foi imobilizado nas placas de ELISA (ou BSA, como controle negativo), as quais foram bloqueadas; foram adicionadas concentrações crescentes de cada proteína recombinante, diluídas em PBS. A detecção foi realizada como descrito anteriormente na sessão 3.16.

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

3.18. Avaliação da participação dos resíduos de lisina das proteínas recombinantes na interação com o plasminogênio

A avaliação da participação dos resíduos de lisina contidos nas proteínas recombinantes na interação com o plasminogênio foi avaliada pela técnica de ELISA conforme descrito por (VIEIRA et al., 2009). Resumidamente, 1 µg de proteína recombinante foi colocado para interagir com plasminogênio na presença de 2 mM ou 20 mM do análogo de lisina, o ácido aminocapróico (ACA), ou ausência do mesmo (máximo de ligação). Em seguida, a interação plasminogênio-proteína foi detectada pela adição de anticorpo monoclonal anti-His.

Para a análise estatística a interação das proteínas recombinantes com o plasminogênio na presença do ACA foi comparada com sua interação na ausência do ACA (0 mM) utilizando o teste t bicaudal.

3.19. Inibição do coágulo de fibrina

A proteína recombinante LIC11112 (4 µM) foi incubada com fibrinogênio (1 mg/mL) por 2 horas a 37 °C. Foram colocados 90 µL da solução de fibrinogênio mais proteína recombinante em cada poço de uma placa de ELISA, bem como 10 µL de uma solução 10 U/mL de trombina humana (Sigma), para iniciar a formação do coágulo de fibrina. A reação foi prolongada por 45 minutos e foram empregados controles negativos, no qual a trombina foi omitida da reação, e um controle positivo, no qual não houve incubação do fibrinogênio com a proteína recombinante, ou seja, uma situação onde o coágulo se forme livre de interferência. A formação do coágulo de fibrina foi medida por meio da leitura da turbidez no comprimento de onda de 595 nm em intervalos de 10 minutos. Os resultados são expressos em porcentagem de formação do coágulo, sendo a turbidez do coágulo no tratamento sem incubação com recombinante, ao final da cinética, considerada 100%.

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

3.20. Avaliação da conservação proteica em diferentes estirpes de *Leptospira* por *western blotting*

Foram utilizadas as seguintes estirpes: *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M20), *L. interrogans* sorovar Copenhageni (L1-130), *L. kirschnerii* sorovar Grippotyphosa, *L. santarosai* sorovar Shermani, *L. borgpetersenii* sorovar Whitcomb, *L. noguchii* sorovar Panama e *L. biflexa* sorovar Patoc. As células bacterianas foram coletadas do meio de cultura EMJH líquido, centrifugadas a 3.075 x g por 15 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano foi ressuspendido em 1 mL de PBS 1X. A quantidade celular foi padronizada após mensuração por absorbância a 420 nm. Entao, as amostras foram novamente centrifugadas e ressuspendidas para um volume final de 100 µL, adicionando tampão SDS, seguido de aquecimento a 96 ºC por 5 minutos.

As proteínas contidas nos extratos bacterianos foram submetidas a eletroforese de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15%, e então eletrotransferidas para uma

membrana de nitrocelulose. Essa membrana foi incubada primeiramente com o antissoro anti-rLIC20143 (diluição de 1:500), e então lavada, para ser incubada novamente com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000) (Sigma-Aldrich). A detecção foi realizada conforme descrito no item 3.12.

3.21. Imunofluorescência

O ensaio foi realizado conforme descrito por SANTOS et al., (2018), com algumas modificações. Resumidamente, *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe M20 e L1-130 foram centrifugadas após crescimento em meio de cultura (3,075 × *g*, 15 min), ressuspendidas em solução de paraformaldeído 2% por 40 minutos a 30°C e incubada com solução de PBS contendo 5% BSA. As leptospiras foram tratadas com antissoro contra rLIC20143, seguido de incubação com DAPI e anti-IgG de camundongo conjugado com *fluorescein isothiocyanate* (FITC, Sigma-Aldrich). As lâminas foram preparadas utilizando ProLong Gold Antifade (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) para garantir a integridade da fluorescência. Soros contra LipL31 (proteína de membrana interna) e uma mistura de soros contra LipL46, LipL41 e LipL21 (proteínas de membrana externa) foram usadas com controles negativo e positivos, respectivamente. As lâminas preparadas tiveram suas imagens capturas e geradas pelo microscópio confocal de imunofluorescência modelo LSM 510 META (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

3.22. Ensaios enzimáticos

O efeito enzimático sobre o substrato cromogênico N-benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (L-BAPA, Sigma-Aldrich) foi realizado de acordo com o método descrito por ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN (1961). Resumidamente, L-BAPA foi ressuspendido em acetona e água (1:1), se tornando uma solução estoque de 25 mg/mL. Então, essa solução foi diluída 20 vezes e colocada em contato com tripsina (controle positivo), rLIC20143 (concentração de 0,4 µg/µL) e água como branco, ensaio realizado em triplicata. A reação foi incubada por 2h a 37 °C. Após o período, a reação foi parada com a adição de ácido acético 30% e foi lida a absorbância em espectrofotômetro a 405 nm.

Também foi realizado um ensaio enzimático com o *Pierce Fluorescent Protease Assay Kit* (ThermoFisher), que consiste em caseína marcada com fluoresceína para uso como substrato a fim de avaliar a atividade de protease. A solução estoque do reagente FTC-caseína foi preparada dissolvendo-o em água ultrapura para uma concentração de 5 mg/mL. Para realização do ensaio, a solução estoque foi diluída 1:500 em tampão TBS (25mM Tris, 0.15M NaCl, pH 7.2). Foi utilizada tripsina como controle positivo em diluição seriada iniciando com concentração de 0,5 µg/mL. A proteína rLIC20143 foi utilizada para avaliação de atividade enzimática também em diluição seriada iniciando com a maior concentração disponível de 0,4 µg/µL. Foram adicionados 50 µL de controle positivo (tripsina), controle negativo (somente tampão) e proteína rLIC20143 em placas de 96 poços e adicionado a eles 50 µL do substrato FTC-caseína. Foi incubado em temperatura ambiente por 60 minutos. A leitura foi realizada utilizando no aparelho Fluoroskan Ascent FL, utilizando os filtros 485/538 nm.

Um terceiro ensaio enzimático foi realizado. Foi avaliado a degradação da caseína total (Sigma). A proteína recombinante LIC20143 (1 µg) foi incubada com caseína (4 µg) a 37 °C por 16 horas em tubos de 1,5 mL com volume final de 50 µl em tampão Tris (10 mM) e NaCl (150 mM). A degradação foi visualizada em SDS-PAGE 12,5%, após terem sido adicionadas às amostras tampão de corrida e aquecidas a 96°C por 5 minutos. Após a corrida, o gel foi corado Coomassie blue.

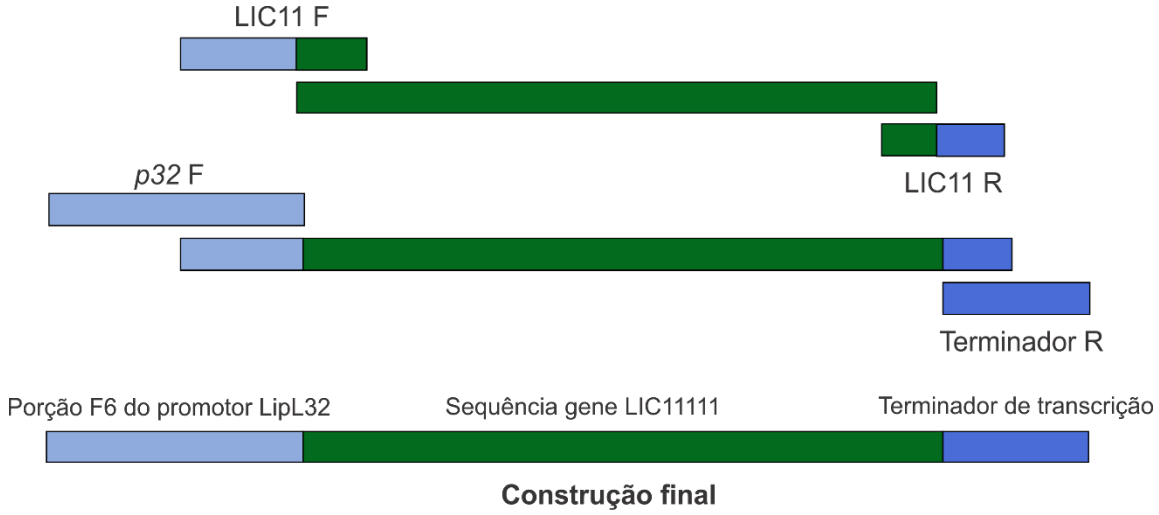
3.23. Construção *L. biflexa* sorovar Patoc recombinante

3.23.1. Estratégias de clonagem

Inicialmente a região codificadora do gene LIC11111 foi amplificado usando um oligonucleotídeo *forward* (LIC11 F) que continha uma sequência a 5' complementar ao final da sequência do promotor mínimo funcional (F6) do gene *lipL32* e um oligonucleotídeo *reverse* (LIC11 R) que continha uma sequência complementar à sequência do terminador de transcrição (**Figura *13***). Após essa primeira amplificação, o produto de PCR gerado foi utilizado como molde para uma segunda rodada de PCR, dessa vez utilizando um oligonucleotídeo *forward* (p32 F) complementar a sequencia inserida na primeira rodada de PCR, assim como um oligonucleotídeo *reverse*

(Terminador R) complementar a sequência inserida do terminador de transcrição. Ao final da segunda amplificação, obteve-se uma sequência que era composta pela região do promotor mínimo da *lipL32*, pelo gene de interesse a ser estudado, nesse caso a LIC11111 e pela região do terminador de transcrição (Quadro 3). A atividade transicional do promotor mínimo F6 foi caracterizada previamente pelo nosso grupo (dados não mostrados).

Figura 13 - Esquema geral do PCR para obtenção da construção final da LIC1111 fusionada com a porção do promotor mínimo (F6) da *lipL32*.



Esquema da estratégia utilizada para construção da sequência a ser ligada no vetor de expressão pMaORI, contendo a região mínima do promotor da *lipL32* (F6), o gene de interesse – LIC11111 e o terminador de transcrição.

Quadro 3 - Sequências de oligonucleotídeos sintetizados para obtenção da sequência a ser ligado no pMaORI.

	Sequência de oligonucleotídeos
p32F (F6)	ATCG**GCGGCCGC**TTTAAACTCAAATTATATC (***Not*I**)
LIC11 F	TTCCTAACTAAGGAGAGTCTATGAAATTTTATTTTTTCAAAATC
LIC11 R	AATATAGCCAGCCAAAAAAGTCAATGTAAATTGTCTAATTTATC
Terminador R	**TCTAGA**CGAAAAGCTTTTTTTGGCTGCAATATAGCCAGCCAAA AAAG (***Xba*I**)

Após a obtenção da sequência completa, o *amplicon* foi purificado (conforme o descrito na subsessão 3.4) e submetido a um ensaio de digestão para posterior ligação no vetor de expressão pMaORI (PAPPAS; BENAROUDJ; PICARDEAU, 2015), um vetor replicativo tanto em *E. coli* quando em *Leptospira* (**Figura *14***). Os

sítios de restrição utilizados foram *Not*I e *Xba*I. Após a digestão, foi feita a reação de ligação de acordo com o protocolo do fabricante (T4 DNA Ligase Buffer, Invitrogen™). Em seguida as bactérias competentes π1 foram transformadas com o plasmídeo clonado com o gene LIC11111. Estas estirpes são utilizadas em virtude da origem R6K-gama contida no plasmídeo, sendo necessária a proteína Pi para sua replicação (PAPPAS; BENAROUDJ; PICARDEAU, 2015).

Figura 14 - Representação esquemática do vetor plasmídeo pMaORI

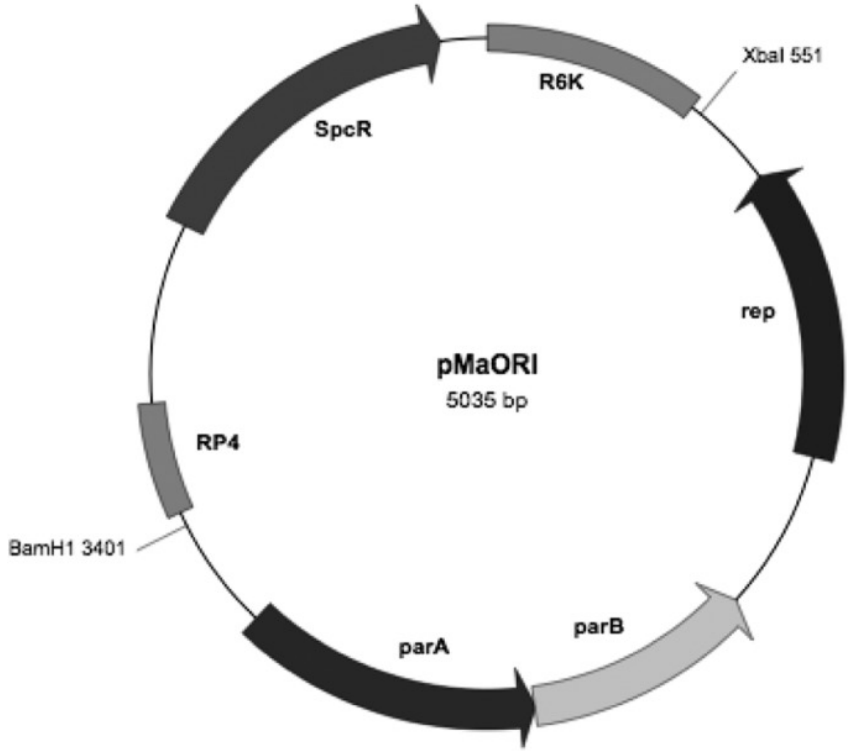
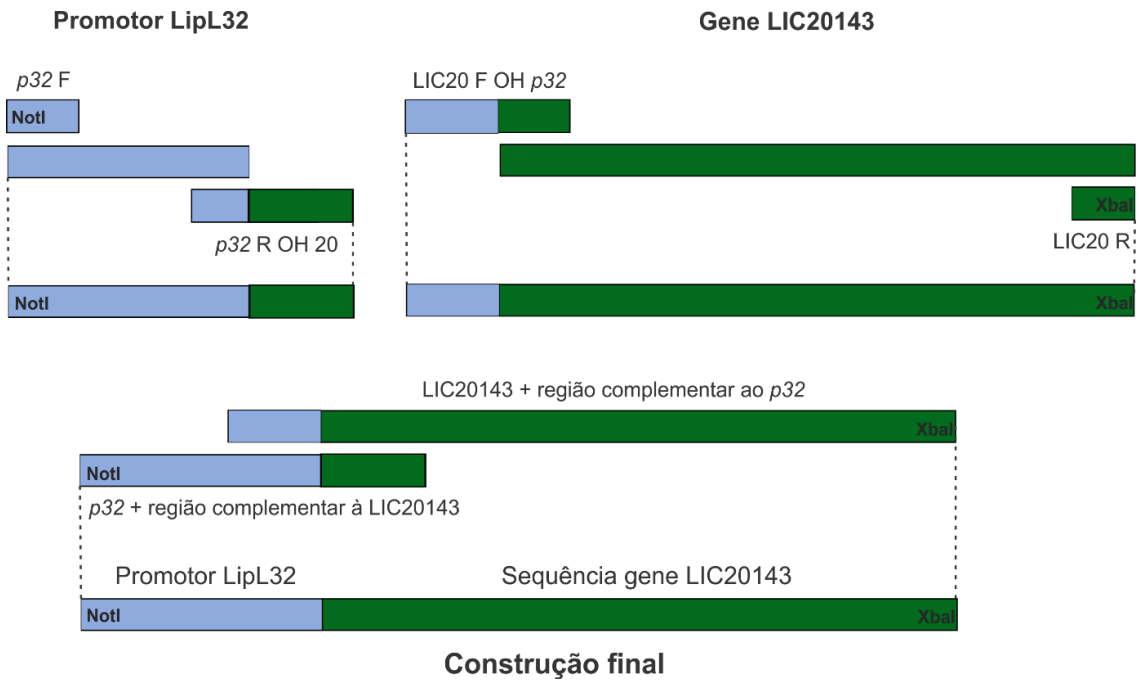


Diagrama do plasmídeo pMaOri usados para transformar *L. biflexa.* SpcR: gene de resistência a espectinomicina.
Fonte: Pappas; Benaroudj; Picardeau, (2015).

Outra estratégia adotada para clonagem baseou-se em amplificar a região completa (aproximadamente 300 pb) do promotor da *lipL32* utilizando um oligonucleotídeo *forward* (p32 F) e um oligonucleotídeo *reverse* com *overhang* (OH) da LIC20143 (p32 R OH 20), no qual possui uma região complementar ao início do gene da LIC20143, simultaneamente foi amplificada o gene da LIC20143 utilizando um oligonucleotídeo *forward* que continha uma região complementar ao fim do promotor da *lipL32* (LIC20 F OH p32) e um oligonucleotídeo *reverse* (LIC20 R). Após as duas regiões amplificadas, realizou-se uma segunda PCR onde os dois produtos da primeira PCR foram misturados para realizar a fusão, uma vez que eles possuíam

regiões complementares (**Figura *15***, Quadro 4). A hibridização das regiões complementarem fornece extremidade 3'OH livre para extensão da DNA polimerase.

Figura 15 - Esquema geral do PCR para clonagem na estratégia de "overhang"



Esquema da estratégia utilizada para construção da sequência a ser ligada no vetor de expressão pMaORI

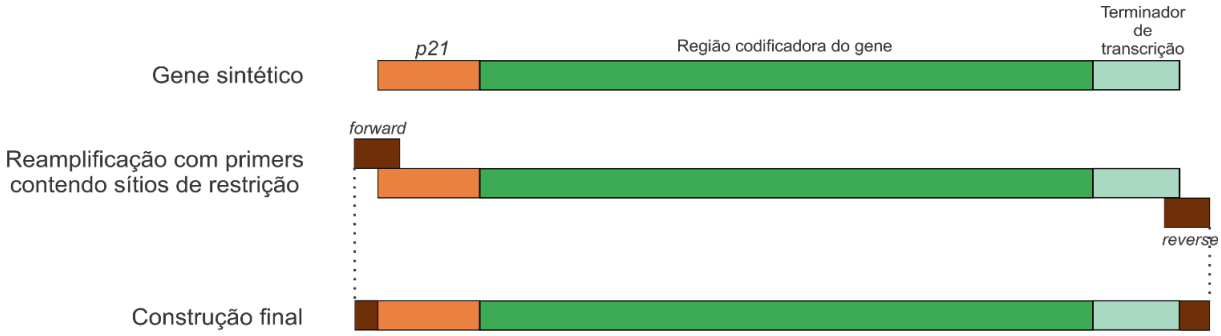
Quadro 4 - Oligonucleotídeos usados na estratégia de clonagem de "overhang"

	Sequência de oligonucleotídeos
p32 F	ATCG**GCGGCCGC**GAACAAGAAAGAGTCAGAG (***Not*I**)
LIC20 OH p32	GTGATTTTCCTAACTAAGGAGAGTCTATGACGGCAATATTATC ATTTTCT
p32 R OH 20	GATTCTAAAAGAAAATGATAATATTGCCGTCATAGACTCTCCT TAGTTA
LIC 20R	ATCG**TCTAGA**TTATTCCAGACCGTAAATTTTAC (***Xba*I**)

Uma terceira estratégia adotada foi a encomenda de genes sintéticos com a região codificadora dos genes LIC11111, LIC20143 e LIC11112 fusionadas com a região completa do promotor da *lipL21* e com uma região de terminador de transcrição.

Estas sequências foram reamplificadas para incluir em suas extremidades regiões de restrição, a fim de permitir a ligação no vetor de expressão pMaORI (**Figura *16***, Quadro 5). Para os genes LIC11111 e LIC11112 foram utilizadas as regiões para restrição de *Xba*I e *Not*I, já para o gene LIC20143 foram *Sac*I e *Not*I. Após a etapa de amplificação, foram obtidos os produtos finais com as regiões de restrição incluídas na sequência.

Figura 16 - Esquema geral do PCR para obtenção da construção final dos genes sintéticos da LIC11111, LIC11112 e LIC20143 fusionada com a porção do promotor *lipL21*.



A região do gene sintético contendo o gene de interesse, fusionado ao promotor completo do gene da *lipL21* (p21) e ao terminador de transcrição foram reamplificados utilizando oligonucleotídeos que continham os sítios de restrição

Quadro 5 - Sequências de oligonucleotídeos sintetizados para obtenção da sequência a ser ligado no pMaORI.

	Sequência de oligonucleotídeos
pLipl21F_*Sac*I	ATGCGAGCTCCCTTCCATCCATTTTTCCAG
pLipl21F_*Xba*I	ATGCTCTAGACCTTCCATCCATTTTTCCAG
Terminador final R_*Xba*I	**TCTAGA**CGAAAAGCTTTTTTTGGCTGCAATATAGCCAGCCAAAAAAG **(*Xba*I)**
Terminador final R_*Not*I	**GGCCGC**CGAAAAGCTTTTTTTGGCTGCAATATAGCCAGCCAAAAAAG**(*Not*I)**

3.23.2. Transformação de L. biflexa sorovar Patoc

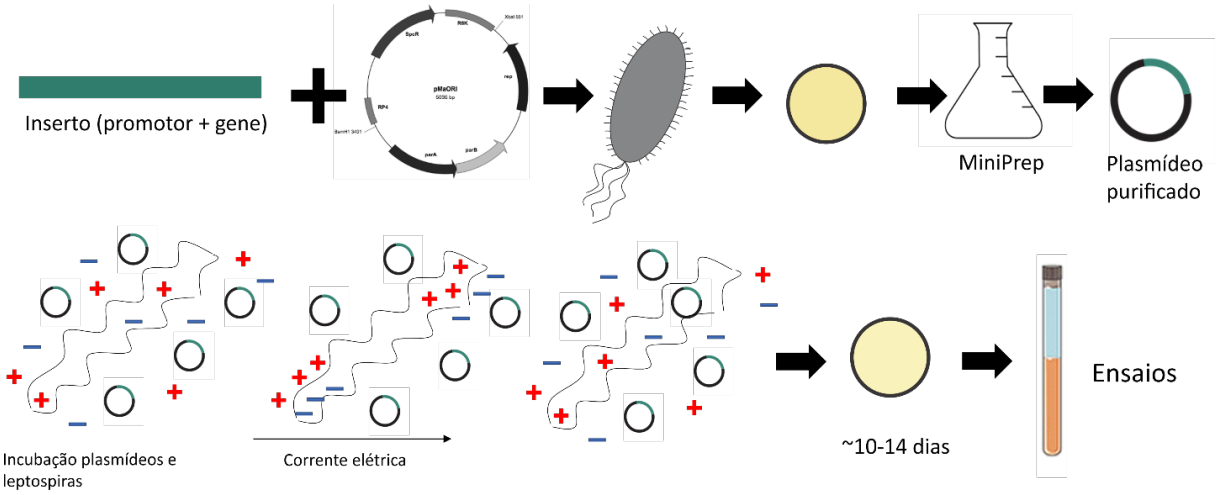
3.23.2.1. Eletroporação

Células de *L. biflexa* foram crescidas em 100 mL de meio EMJH contendo 10 % de suplemento em fase log de crescimento (OD420 nm ~0,4), centrifugadas e então o sedimento resultante foi lavado com 50 mL de água estéril. O sedimento formado após a lavagem foi ressuspendido em 1 mL de água estéril.

As células competentes frescas (100 µL) foram incubadas com diferentes massas de pMaORI contendo os cassetes de interesse (LIC11111 ou LIC20143) por aproximadamente 20 minutos e então foram transferidos para as cubetas de eletroporação. Após a eletroporação (1800V, 25 µF, and 200 Ω), 1 mL de meio EMJH foi adicionado às células, as quais foram incubadas a 30 ºC por 16 horas. Após, 200 µL das suspensões foram semeados em placas de Petri contendo meio EMJH sólido e 40 µg/mL de espectinomicina e incubadas a 30 ºC por até 2 semanas, tempo médio necessário para o aparecimento das colônias (**Figura *17***). Como controle negativo, foi utilizada *L. biflexa* transformada com o vetor pMaORI vazio. A confirmação da presença dos plasmídeos foi avaliada por PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos que flanqueiam a região de inserção da sequência de interesse (Quadro 6).

Clones positivos foram crescidos em meio líquido para posterior avaliação da transcrição dos genes de interesse, por ensaio de RT-qPCR conforme descrito na seção 3.13.

Figura 17 - Esquema geral da técnica de transformação por eletroporação



Esquema geral da obtenção dos plasmídeos para transformação em *L. biflexa*. Inicialmente os genes são clonados no vetor pMaORI replicativo tanto em *Leptospira* quanto em *E. coli*, então bactérias π1 são transformadas e plaqueadas em meio contendo espectinomicina e dT para selecionar colônias positivas. Crescidas as colônias em meio sólido, estas são inoculadas em meio líquido, e é realizado um miniprep para isolar o plasmídeo. Com o plasmídeo purificado, *L. biflexa* é transformada pelo método de eletroporação, onde é aplicada uma corrente elétrica, abrindo poros na membrana da bactéria por onde o vetor consegue adentrar a célula. Após o choque elétrico, a *L. biflexa* transformada é colocada para crescer em meio solido EMJH contendo suplemento por aproximadamente 10 dias ou até que apareçam colônias.

Quadro 6 - Sequência dos oligonucleotídeos para confirmação da ligação no vetor pMaORI

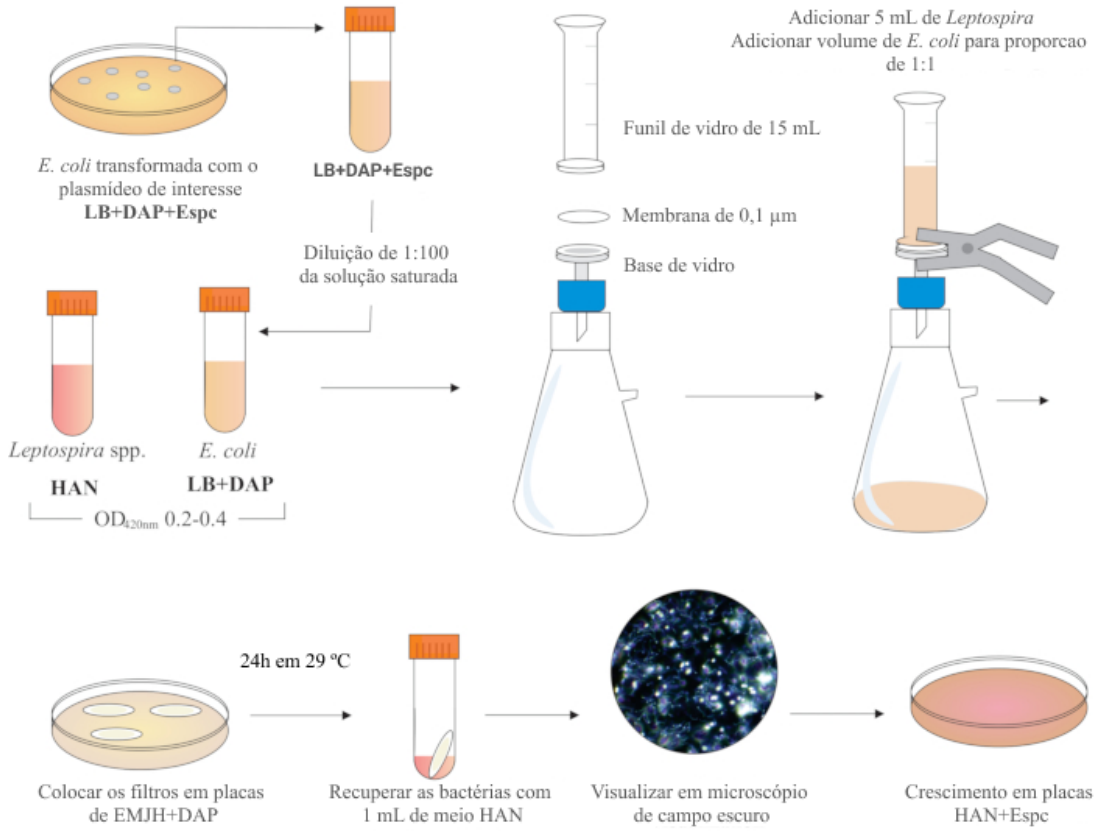
	Sequência de oligonucleotídeos
pMaORI F	AGTGACACAGGAACACTTAACG
pMaORI R	TATATTCTGTCCACATTTGTGG

3.23.2.2. Conjugação

A transformação por conjugação foi feita em proporções de células do receptor e doador 1:1 e tempo de conjugação 24h usando meio EMJH acrescido de DAP. A estirpe doadora *E. coli* β2163 foi transformada com plasmídeos conforme descrito na seção 3.4.2 e uma única colônia foi colocada para crescimento por 12h em LB líquido com a mesma suplementação. Em seguida, as culturas saturadas foram diluídas em meio LB acrescentado de DAP e incubadas até OD_{420nm} de 0,3–0,5 para conjugação

com *L. biflexa*, previamente cultivadas para OD_{420nm} de 0,3–0,5 (fase *mid-log*). 5 mL de cultura de *L. biflexa* foram misturados com 5 mL de *E. coli* doadora recombinante por filtração na superfície de uma membrana hidrofílica de ésteres de celulose mistos com poro de 0,1 µm de 25 mm de diâmetro (Millipore Sigma). Os filtros foram transferidos para placas de ágar EMJH contendo DAP e incubados por 24h a 29 °C. Após a conjugação, *L. biflexa* foi recuperada dos filtros por pipetagem com 1 mL de meio EMJH, as culturas foram confirmadas por microscopia de campo escuro, e então 100 µL foram plaqueados em placas EMJH contendo 10% de suplemento e espectinomicina (40 µg/mL) e incubado a 29 °C. As colônias foram recuperadas e passadas para meio EMJH líquido contendo espectinomicina, as suspensões foram visualizadas por microscopia de campo escuro para confirmar a presença de leptospiras móveis. Após o crescimento, em torno de 10 dias, as culturas foram avaliadas por PCR com os iniciadores pMaORI F e R (Quadro 6) para confirmar a presença de plasmídeos. A **Figura *18*** exibe um esquema geral do protocolo de transformação por conjugação.

Figura 18 - Esquema geral da técnica de transformação por conjugação.



L. interrogans é cultivada em meio EMJH, sob agitação, até DO de 0,2-0,4 (fase *mid-log*) a 420 nm. Um dia antes da conjugação, uma colônia de *E. coli* recombinante β2163 contendo

o plasmídeo de interesse é colhida de placas ágar LB + DAP + Spc e colocada para crescer em meio LB líquido com a mesma suplementação. No dia seguinte, culturas de *E. coli* saturadas são diluídas em LB mais DAP e cultivadas até DO de 0,2-0,4 a 420 nm. Tanto a *E. coli* doadora quanto a *Leptospira* são misturadas na proporção de células de 1:1 na superfície de um filtro de 0,1 µm por um aparelho de filtração sob pressão negativa. Em seguida, os filtros são colocados em placas de ágar EMJH suplementadas com DAP, e incubadas por 24 h a 29 °C. O uso de EMJH limita a proliferação de *E. coli* e a proporção de 1:1 é mantida. As bactérias são recuperadas dos filtros por pipetagem com 1 mL de meio EMJH, e as suspensões são visualizadas em microscopia de campo escuro. Finalmente, 100-200 µL de cada suspensão são semeados em placas de ágar EMJH contendo 10% de suplemento e incubados a 37 °C em 3% de CO2. Nesta fase, o DAP é omitido e, como resultado, a *E. coli* auxotrófica não prolifera.
Fonte: Adaptado de Fernandes et al., (2021).

3.24. Comitê de ética animal e humano

Todos os estudos utilizando animais foram aprovados pelo comitê de ética do Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil sob protocolo nº. 6736110219. O comitê de Pesquisa Animal no Instituto Butantan adota o guia do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Este trabalho foi analisado pelo CEPSH (Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos) sob o protocolo CEP-ICB nº 870/2017. O Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) utilizado para este trabalho está sob o protocolo nº 78770117.0.0000.8098.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise bioinformática

De acordo com as análises do software LipoP os genes LIC11111, LIC11112 e LIC20143 estudados codificam para proteínas que provavelmente serão exportadas para membrana da *Leptospira,* devido à presença do sinal SpI. Com o auxílio do programa CELLO foi analisada a provável localização celular dessas proteínas, sendo que as três possuem alta probabilidade de serem exportadas para a membrana externa ou de serem secretadas.

Segundo as análises realizadas pelo programa SMART a proteína codificada pelo gene LIC11111 possui um domínio PDZ conservado entre os aminoácidos 175 e 280 na região do C-terminal, o qual poderia mediar a interação proteína-proteína. A LIC11112 possui um domínio serino-protease do tipo tripsina entre os aminoácidos 62

e 201 na região N-terminal (Quadro 7). A LIC20143 se apresenta como uma HtrA completa possuindo um domínio de serino-protease entre os aminoácidos 56 e 243 e um domínio PDZ entre 252 e 345.

Quadro 7 – Resumo das características preditas pelas análises de bioinformática para os genes em estudo

Gene ID	Descrição	Sítio de clivagem	Domínio conservado
LIC11111	HtrA2	24-25	PDZ
LIC11112	Serino-protease	20-21	Serino-protease do tipo tripsina
LIC20143	HtrA1	38-39	PDZ e serino-protease do tipo tripsina

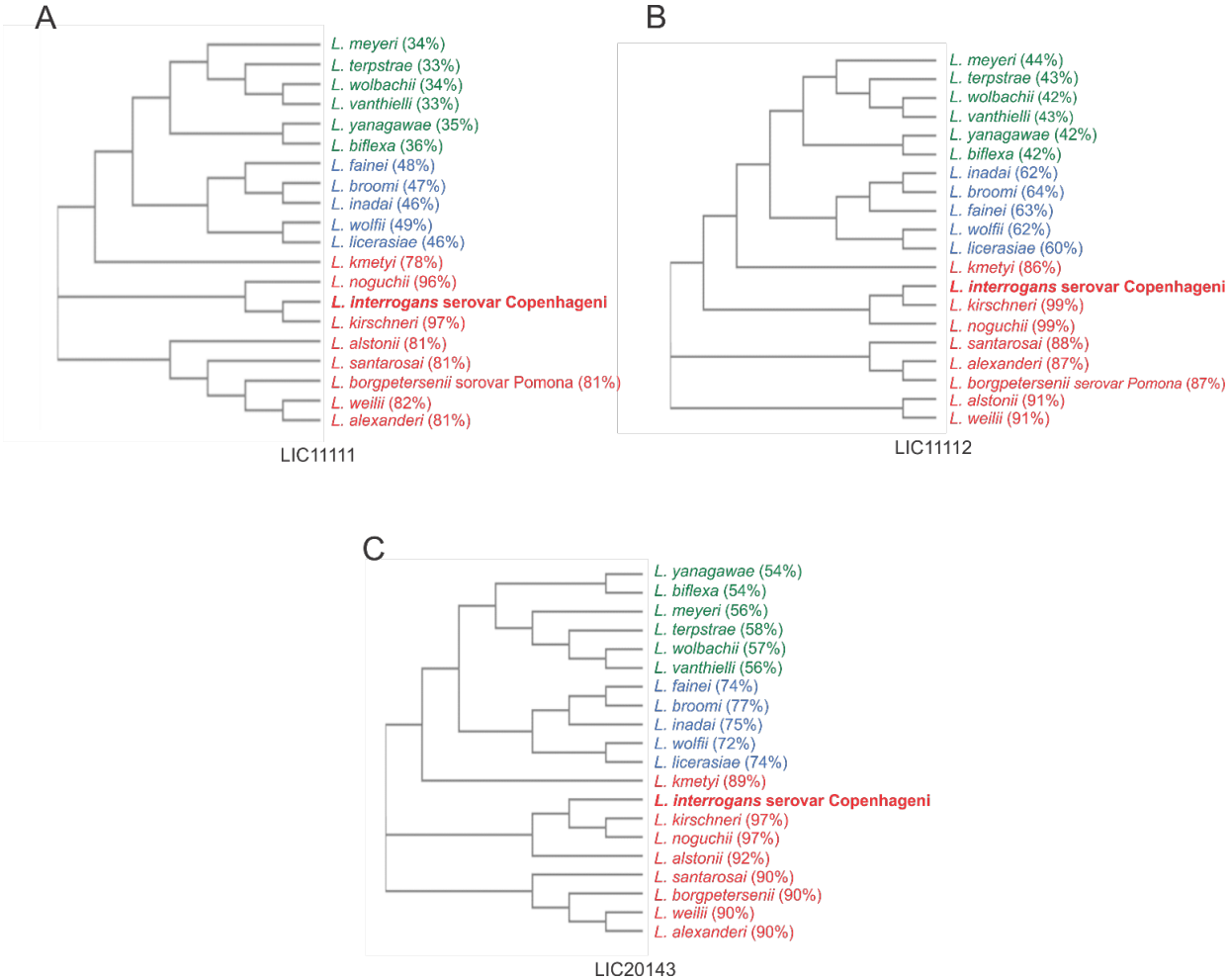
Notas: Gene ID – identificação do gene no genoma. [1]http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic.. LIC*: Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni.

Atualmente, encontram-se depositadas diversas sequências para diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* (ESLABÃO et al., 2018; FOUTS et al., 2016; JORGE et al., 2018, 2019; MORENO et al., 2018). Entretanto, os primeiros sequenciamentos completos realizados foram com as espécies *L. interrogans* sorovar Lai (REN et al., 2003), sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004b) e sorovar Bratislava (ALT et al., 2015), *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo- bovis (BULACH et al., 2006), *L. santarosai* sorovar Sherman (CHOU et al., 2012), *L. licerasiae* sorovar Varillal (RICALDI et al., 2012) e *L. biflexa* sorovar Patoc (PICARDEAU et al., 2008).

Por meio da análise comparativa das sequências de aminoácidos das proteínas de interesse com outras espécies e sorovares depositados em um banco de dados, verificou-se que as três proteínas são conservadas em diferentes espécies patogênicas de *Leptospira* (**Figura *19***A, B e C) De acordo com a **Figura *19***A é possível observar que a LIC11111 possui uma similaridade de 46% com a espécie intermediária *L. licerasiae* sorovar Varillal e 36% (tendo uma cobertura de 93%) com a *L. biflexa* sorovar Patoc.

A Figura **Figura *19***B mostra que a LIC11112 possui similaridade com sequências de duas espécies intermediárias, sendo 64% (com 98% de cobertura) para *L. broomii* sorovar Hurstbridge e 62% (com 98% de cobertura) para *L. inadai* sorovar Lyme, enquanto para a sequência da *L. biflexa* sorovar Patoc a similaridade cai para 42%. Já a LIC20143 possui similaridade em torno de 90-98% com as patogênicas, em torno de 70 com as intermediárias e de 50% com as saprofíticas (**Figura *19***C).

Figura 19 - Cladograma das sequências de aminoácidos codificadas pelos genes (A) LIC11111, (B) LIC11112 e (C) LIC20143

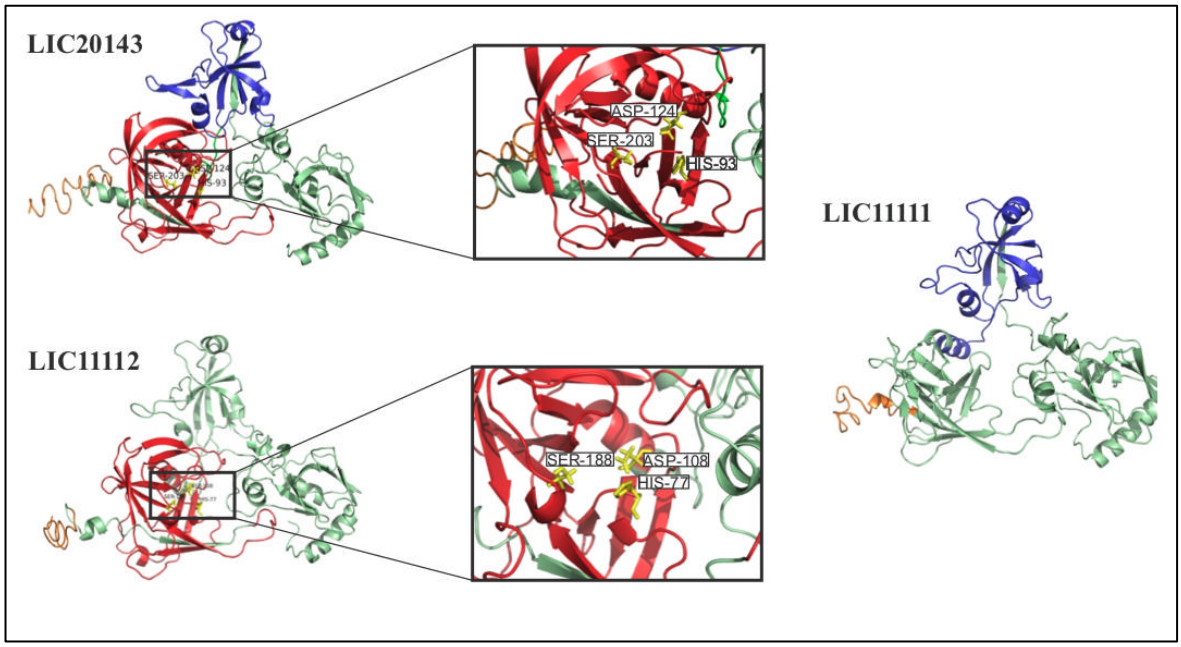


Sequência das estirpes patogênicas (vermelho), intermediárias (verde) e saprofíticas (azul) foram alinhadas pelo Clustal Omega e o cladograma foi gerado por alinhamento múltiplo. Notas: Os valores em parênteses se referem as porcentagens de identidade.

A previsão da estrutura 3D das proteínas LIC20143, LIC11111 e LIC11112 foi modelada usando o software online I-TASSER. A **Figura *20*** foi gerada usando o programa PyMOL. Os domínios proteolíticos são mostrados em vermelho, enquanto os domínios PDZ estão em azul. O peptídeo sinal é mostrado em laranja, e as regiões com funções desconhecidas estão em verde. A tríade catalítica é indicada por bastões amarelos. O domínio da serino-protease está presente em LIC20143 e LIC11112 e um aumento foi feito para melhor visualização dos três resíduos de aminoácidos responsáveis pela região catalítica: uma histidina (His), um ácido aspártico (Asp) e uma serina (Ser), conforme descrito por PALLEN; WREN, (1997). LIC20143 possui as possíveis posições dos aminoácidos: His-93, Asp-124 e Ser-203; LIC11112 His-77,

Asp-108 e Ser-188. Apenas a proteína LIC11112 não possui o domínio PDZ de acordo com as análises *in silico*.

Figura 20 - Modelo teórico 3D de LIC20143, LIC11112 e LIC11111 de *L. interrogans* serovar Copenhageni.



O modelo 3D foi gerado pelo I-TASSER e visualizado pelo PyMOL. As regiões em vermelho representam o domínio da serino-protease, em azul o domínio PDZ e em laranja a região do peptídeo sinal. A tríade catalítica (histidina, aspartato e serina; HDS) é representada como bastões amarelos e o número de posição correspondente do resíduo. As regiões em verde não possuem nenhuma função específica.
Fonte: Adaptado de Daroz et al. (2020)

Depois de pesquisar aminoácidos conservados pertencentes ao domínio da serino-protease e descobrir que LIC20143 e LIC11112 possuem a tríade catalítica, um alinhamento foi realizado para avaliar se essas duas proteínas poderiam ser alinhadas uma com a outra. Foi visto que a tríade é conservada entre essas sequências, embora o resto da sequência de codificação seja diversa (**Figura *21***).

Figura 21 - Alinhamento de LIC20143 e LIC11112 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni

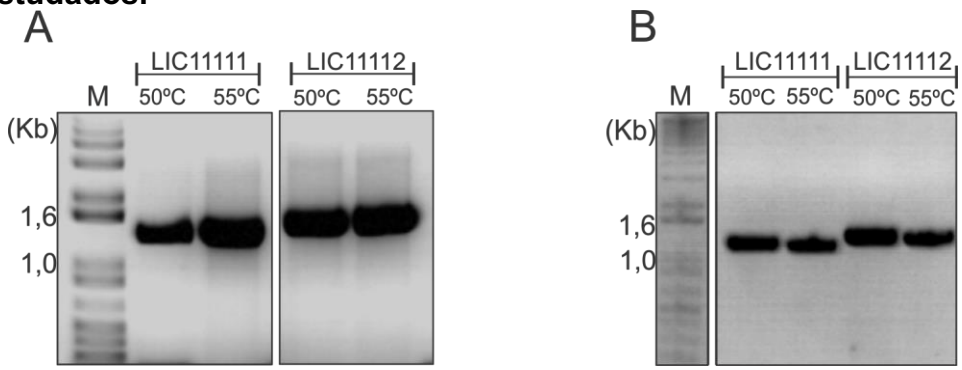
```
LIC20143 1   MTAILSFSFRIWNKIFFKKANRFFSLGFILFIQSG----------------------IYAVENPLPFDEL 48
LIC11112 1   M-----------SKKVF------LNILILLSIFQL----------------------SAQNGNTADLKVL 31

LIC20143 49  RKGVVQIRVYSQAVNP---FTPWTTDAVRAGSGTGFLIGN-KRILTNAHVVSNAKFVQVQRYNQTEWYGV 114
LIC11112 32  LDGVVIIRSDTFSEKED--QDNYSEKSILRDAGTGMIISG-NRILTNAHVVSNSSYLKVKHFNSSKFYKA 98

LIC20143 115 KILHLAHDCDLAVLEAENPEFYKDSRDLQL-GEIPELNSPLIVVGYPIGGNKVSVTRGIVSRKDQSVYSH 183
LIC11112 99  EVQYLGFDCDLAILKVEEDEFFSGVEPLEISEVSPALGSNLLILGYPGGDENITLENGNVSRVERVRYSF 168

LIC20143 184 SAVDSHLVLQVDAAINPGNSGGPAIQD-DKVVGVAFQVATKG---ENIGYLIPTNVIRHFLKDIEDGKYD 249
LIC11112 169 SGLDYRKAIRVNANIIPGYSGGPAIQN-GRVVGITFQVSQSQ---GNVAYLIPPEIINHFLKDVEDGTYH 234

LIC20143 250 GYVELGVRTLNSF-NVFLRKAKGIPDHLEGVFVSKVLKNGSA-ENHLKEGDFLLEIDGQPIGKNGTVMQD 317
LIC11112 235 GFPFPGFSFQNGH-SSSLKSYLKIPEGLNGILINTIYPDSSF-SDLLQPEDFVYKIDNSYLDGDGGIMDE 302

LIC20143 318 KDARVDFVEIVDNKHAGDKISFKLYREGKEISVSFPARRMSDFDFMRNQYDRSYDFEMIGGLLFQEISRD 387
LIC11112 303 IGGFI--GDLIEEKFIGDHIKLFFYRNGKNYKVEGTLKRVPTLDIYRQQNKSSSFLS-GGFLFQPVNRAL 369

LIC20143 388 LITSWGRSGNTSGGSQLLYRFFYFIEDGLNRTKKTDVVLYRKLSHPVNSSSDYFVNMILESVNGIPVGEL 457
LIC11112 370 AGGDSKR-----LESSLRYHYSYYIQDELYRFTDRDILLSGIYPDPLNSKYASYRYKILESINDRTPSDL 434

LIC20143 458 KDLKKILKESKDKYLRLKFLDIQVPLILNREEAEKADEKIRKIYGLE--- 504
LIC11112 435 EDFKSLWKKFYGGTISLKFRGVNLPIILDQDTIDKINIRIKKRFDVEADE 484
```

O alinhamento foi feito usando a ferramenta PROMALS3D, que alinha as sequências considerando a sequência de aminoácidos e os domínios da proteína. Os aminoácidos histidina (H), ácido aspártico (D) e serina (S) são destacados mostrando que estão conservados nessas duas proteínas.
Fonte: Adaptado de Daroz et al. (2020).

4.2. Clonagem

Os genes LIC11111 e LIC11112 foram amplificados a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni utilizando os oligonucleotídeos específicos de acordo com o Quadro 1 pela técnica de PCR. Após a amplificação, os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% apresentando o tamanho esperado de 1266 e 1386 pares de base (pb) para LIC11111 e LIC11112, respectivamente (**Figura *22***).

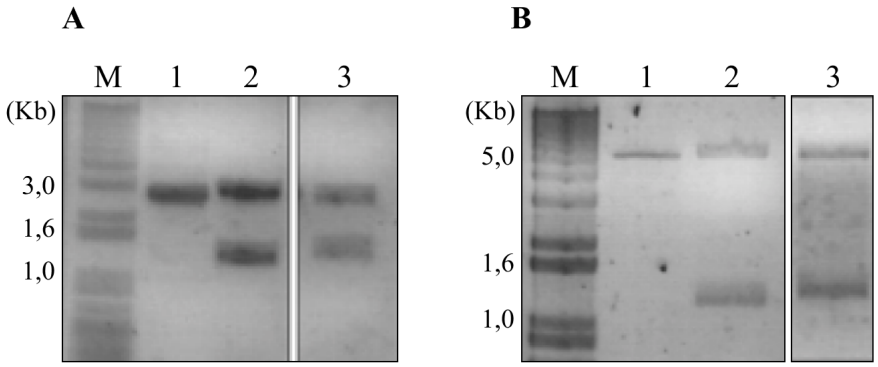
Figura 22 - Visualização dos fragmentos de DNA amplificados referentes aos genes estudados.



Os insertos de DNA obtidos pela técnica de PCR foram separados em gel de agarose 1% e corados com GelRed. Os tamanhos observados foram os esperados de aproximadamente 1266 pb para LIC11111 e 1386 pb para LIC11112, sendo **(A)** os insertos para clonagem no vetor pAE, e **(B)** vetor pET-SUMO, em duas temperaturas de anelamento. O M representa o marcador molecular *1 Kb Plus DNA Ladder*.

Após a purificação dos *amplicons* foi feita uma reação de restrição utilizando as enzimas específicas para cada vetor (estes também previamente digeridos) e subsequentemente feita a ligação nos vetores de expressão pAE e pET-SUMO. Para confirmar a ligação dos insertos foram feitos ensaio de restrição para ambos os vetores pAE e pET-SUMO, onde foi observado a liberação do inserto no tamanho esperado para cada gene (**Figura *23***A e B).

Figura 23 - Géis de confirmação da ligação dos insertos nos vetores de expressão.



Os insertos de DNA ligados nos vetores de expressão pAE e pET-SUMO foram submetidos a um ensaio de digestão, separados em gel de agarose 1% e corados com GelRed**. (A)** Clonagem no vetor pAE, sendo 1 o pAE digerido sem inserto inserido, 2 (pAE-LIC1111) e 3 (pAE-LIC11112) os plasmídeos digeridos com enzimas de restrição *Xho*I e *Hind*III. **(B)** Clonagem no vetor pET-SUMO, sendo sendo 1 o pET-SUMO digerido sem inserto inserido, 2 (pET-SUMO-LIC1111) e 3 (pET-SUMO-LIC11112) plasmídeos digeridos com enzimas de restrição *Eco*RI e *Xho*I. O M representa o marcador molecular *1 Kb Plus DNA Ladder*.

Para confirmar que os fragmentos liberados no gel eram de fato as sequências de interesse, todas as construções foram submetidas a sequenciamento pelo método de terminação de cadeia. Os resultados mostraram que todas as sequências estavam em fase de leitura e não apresentaram mutações (Apêndices A e B).

4.3. Avaliação da expressão das proteínas

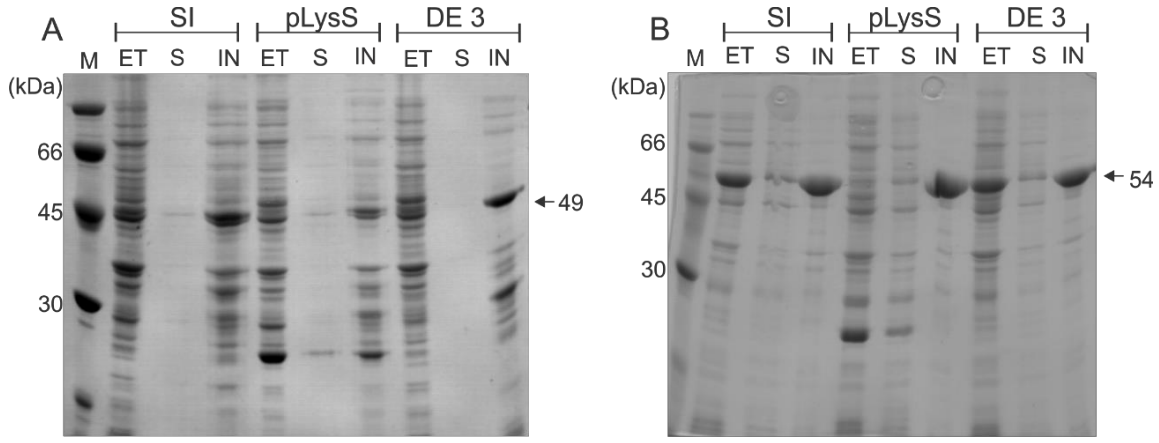
Com o intuito de obter proteínas na sua forma nativa, uma vez que as proteínas estudadas têm indícios de serem enzimas, várias abordagens foram feitas para alcançar esse objetivo. Foram testados 2 vetores de expressão e seis estirpes de *E. coli.*

4.3.1. Vetor de expressão pAE

As estirpes BL21 (DE3), BL21 Star (DE3) pLysS e BL21 SI foram transformadas com os plasmídeos recombinantes pAE-LIC11111 e LIC11112. Foi feito um teste preliminar em pequena escala para se determinar qual a melhor estirpe para se trabalhar em larga escala. Após a transformação as bactérias foram cultivadas até a fase *log*, quando foi adicionado o indutor IPTG na concentração de 1 mM para todas as estirpes exceto a BL21 SI que foi induzida com 300 mM de NaCl. Transcorrido o tempo determinado de indução, sejam 3 horas ou por 12 horas, as culturas foram centrifugadas para remoção do meio de cultura e a massa bacteriana formada foi lisada. Após a lise foi obtido uma fração solúvel e uma insolúvel, sendo o sobrenadante e o sedimento, respectivamente. As frações obtidas foram analisadas em um gel de SDS-PAGE 12%, onde é possível observar que as proteínas foram expressas no tamanho esperado de 49 kDa para LIC11111 e 54 kDa para LIC11112 (**Figura *24***).

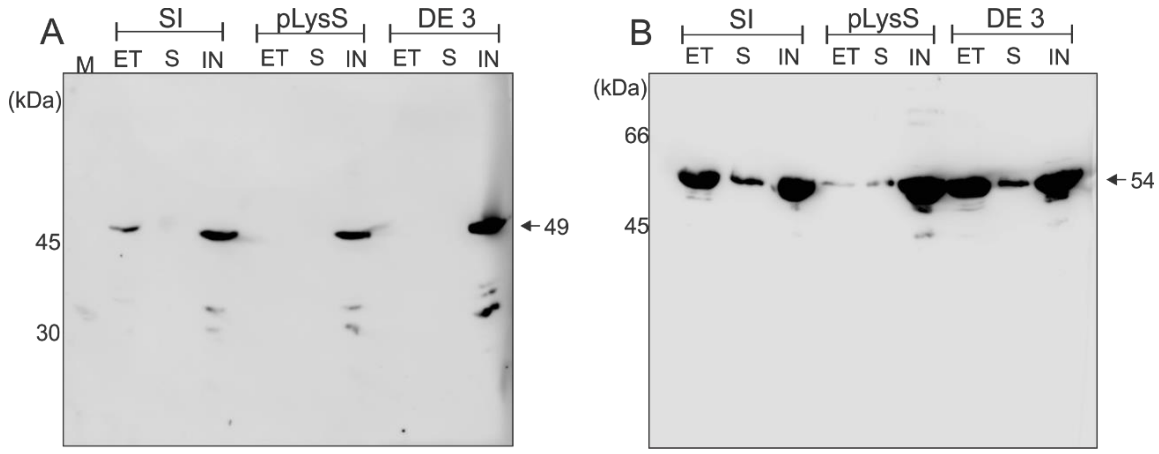
Foi feito um ensaio de *western blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti- His para confirmar a expressão das proteínas recombinantes. É possível observar que a LIC11111 teve uma expressão bem menos notória quando comparada a LIC11112, além de não ter tido nenhuma expressão na fração solúvel (**Figura *25***).

Figura 24 - Análise da expressão das proteínas recombinantes em diferentes estirpes de *E. coli* por meio de SDS-PAGE (12%)



Géis do teste de expressão corados com azul de Coomassie em diferentes estirpes para as proteínas LIC11111 **(A)** e LIC11112 **(B)**. M: padrão de massa molecular; ET: extrato total não induzido; S: fração solúvel; IN: fração insolúvel. Estirpes: BL21(SI); BL21 Star (DE3)pLysS e BL21(DE3).

Figura 25 - Análise das frações de cultura bacteriana após indução de expressão das proteínas recombinantes utilizando anticorpo anti-His por *western blotting*



As frações de interesse foram aplicadas a um gel SDS-PAGE 12% e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-His conjugado com peroxidase (1:10.000) para detecção das proteínas recombinantes proteínas **(A)** LIC11111 e **(B)** LIC11112. M: padrão de massa molecular; ET: extrato total não induzido; S: fração solúvel; IN: fração insolúvel. Estirpes: BL21(SI); BL21 Star (DE3)pLysS e BL21(DE3).

As massas moleculares apresentadas no gel estão de acordo com as massas moleculares calculadas pelo programa ProtParam (GASTEIGER, 2006) tendo como base a composição dos aminoácidos (Quadro 8). Para LIC11112, em todas as estirpes, foi possível observar uma expressão na forma solúvel, apesar de ser em quantidade inferior quando comparada com a fração insolúvel. Já para LIC11111 toda

proteína estava presente na fração insolúvel.

Quadro 8 - Massa molecular e ponto isoelétrico (PI) teórico das proteínas recombinantes estudadas.

Gene ID[1]	Massa molecular (kDa)	PI teórico
LIC11111	49.15	9.2
LIC11112	53.50	5.52
LIC20143	53.36	6.61

Notas: Gene ID – identificação do gene no genoma. [1]http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic. LIC*: Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni.

Foi escolhida então a BL21 (DE3) para indução em larga escala. Os resultados observados mostram que toda a proteína antes solúvel em pequena escala estava em sua totalidade presente na forma insolúvel para as duas proteínas estudadas quando se aumentou a escala de indução sendo o mesmo padrão mantido durante as 3 horas em que as amostras foram coletadas, ou seja, o aumento do volume de indução não permitiu a expressão na forma solúvel (**Figura *26***).

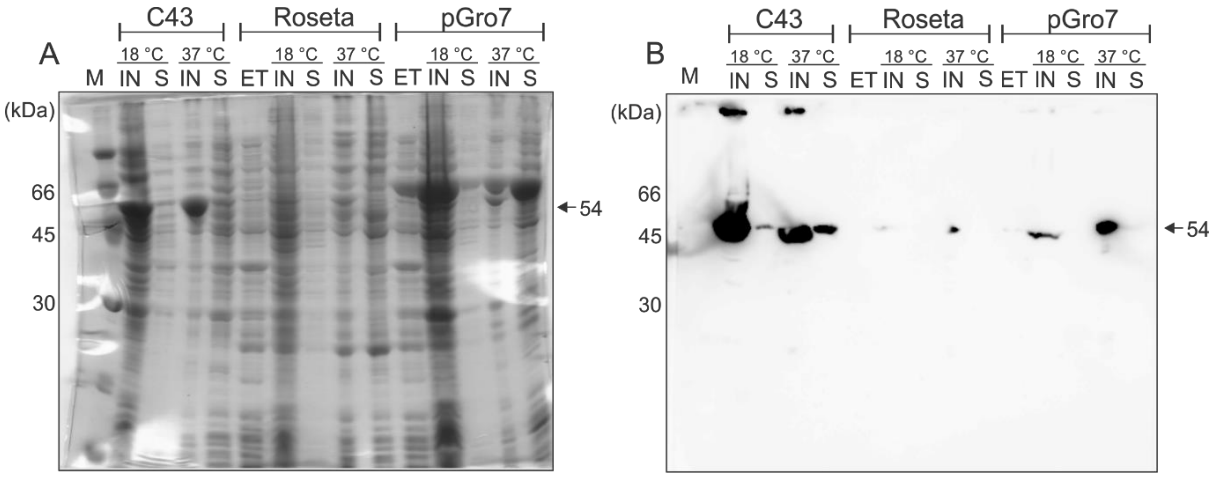
Figura 26 - Análise das frações de cultura bacteriana por western blotting após indução em larga escala das proteínas recombinantes LIC11112 na estirpe BL21 (DE3)

As frações foram aplicadas a um gel SDS-PAGE 12% e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-His conjugado com peroxidase (1:10.000) para detecção das proteínas recombinantes. M: padrão de massa molecular; IN: fração insolúvel; S: fração solúvel. 0,5 h: 30 minutos de indução; 1 h: 1 hora de indução; 1,5 h: 1 hora e meia de indução; 2 h: 2 horas de indução; 3 h: 3 horas de indução.

Dessa maneira, outras três estirpes foram utilizadas para tentar solubilizar as proteínas sendo elas C43 (DE3), BL21 (DE3) pGro7 e Rosetta (DE3) pLysS. O teste

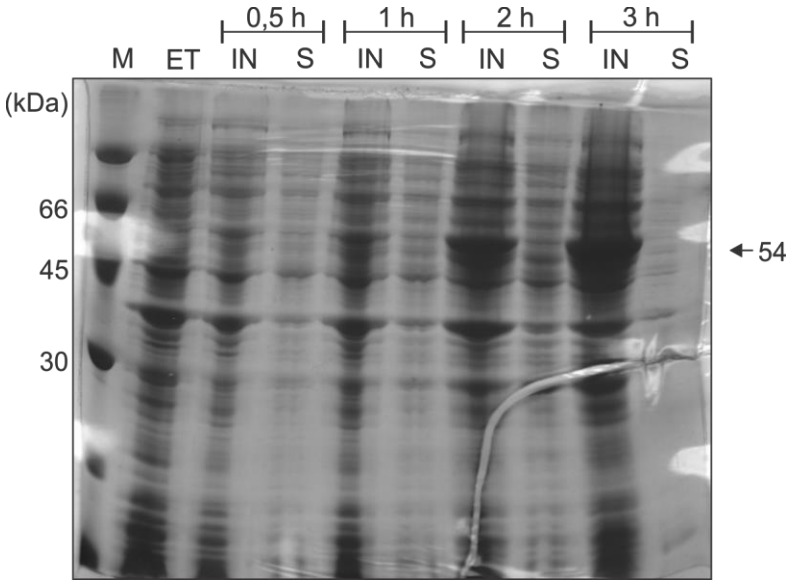
foi feito avaliando duas condições de temperatura: 37 ºC e 18 ºC e, de acordo com a **Figura *27***, é possível observar que tanto a BL21 (DE3) pGro7 quanto a C43 (DE3) produziram proteínas solúveis. Por isso, partiu-se para indução em larga escala utilizando a C43 (DE3), coletando amostras em diversos momentos para monitorar a expressão das proteínas, uma vez que ela foi a que apresentou uma expressão mais acentuada na fração solúvel em 37 ºC, e, assim como a BL21 (DE3) testada anteriormente, toda a proteína foi produzida somente na fração insolúvel (**Figura *28***).

Figura 27 - Análise das frações de cultura bacteriana após indução de expressão da rLIC11112 em três estirpes diferentes a 18 e 37 ºC



Géis do teste de expressão **(A)** Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie **(B)** *Western Blotting: a*s frações foram aplicadas a um gel SDS-PAGE 12% e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-His conjugado com peroxidase (1:10.000). M: padrão de massa molecular; ET: extrato total não induzido; IN: fração insolúvel; S: fração solúvel. 18 ºC: indução a 18 ºC por 16 horas; 37 °C: indução a 37 °C por 3 horas.

Figura 28 - Análise das frações de cultura bacteriana após indução em larga escala das proteínas recombinantes LIC11112 na estirpe C43 (DE3)

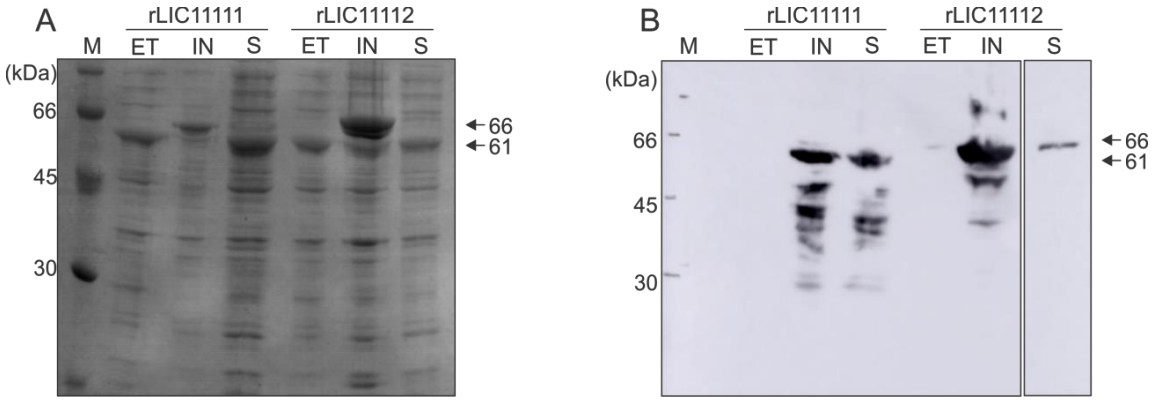


Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie. M: padrão de massa molecular. ET: extrato total não induzido; IN: fração insolúvel; S: fração solúvel; 0,5 h: 30 minutos de indução; 1 h: 1 hora de indução; 2 h: 2 horas de indução; 3 h: 3 horas de indução.

4.3.2. Vetor de expressão pET-SUMO

Os genes clonados no vetor de expressão pET-SUMO foram usados para transformar duas estirpes de *E. coli* C43 (DE3) e BL21 (DE3) pGro7. Ambas as proteínas nas duas estirpes foram expressas no tamanho esperado de aproximadamente 60 kDa para LIC11111 e 64 kDa para LIC11112 (a SUMO possui 12 kDa) na fração solúvel, tendo sido mais bem expressa na BL21 (DE3) pGro7 em pequena escala (dados não mostrados). Por isso, foi feito um teste em larga escala a 18 ºC e, conforme a **Figura *29***A, é possível observar que a proteína se manteve solúvel mesmo em larga escala.

Figura 29 - Análise das frações de cultura bacteriana após indução de expressão das proteínas recombinantes utilizando vetor pET-SUMO.



Géis do teste de expressão **(A)** Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie **(B)** *Western Blotting: a*s frações foram aplicadas a um gel SDS-PAGE 12% e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-His conjugado com peroxidase (1:10.000). M: padrão de massa molecular. ET: extrato total não induzido; IN: fração insolúvel; S: fração solúvel.

Para confirmar a expressão das proteínas observadas em gel SDS-PAGE, foi feito um ensaio de *western blotting* utilizando o anticorpo monoclonal anti-His (**Figura *29***B), uma vez que o pAE e o pET-SUMO permitem a expressão das proteínas recombinantes contendo 6 resíduos de histidina na extremidade N-terminal, possibilitando a purificação por cromatografia de afinidade ao metal.

4.4. Purificação

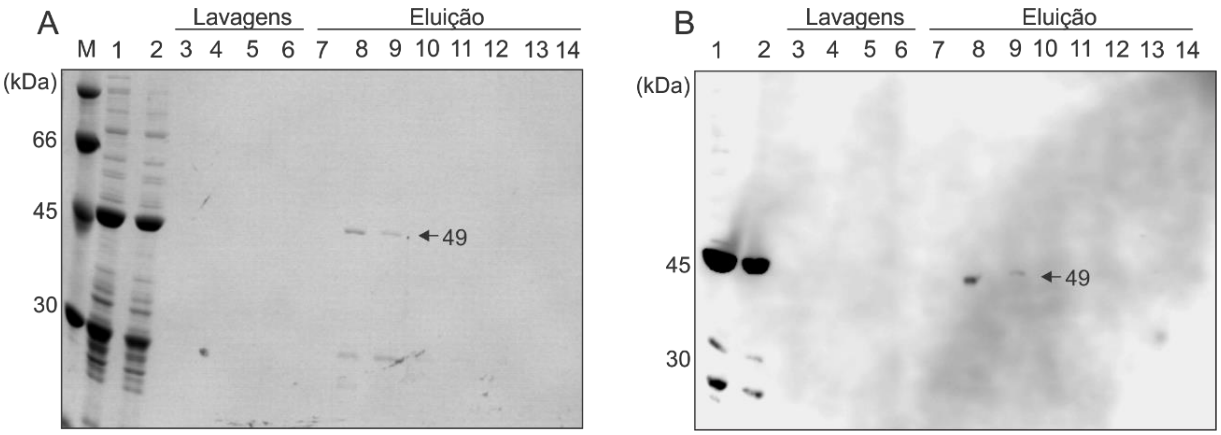
A purificação das proteínas foi feita pelo método de cromatografia de afinidade ao metal, sendo a resina utilizada tratada com níquel. Devido aos resíduos de histidina, a proteína recombinante tem a capacidade de se ligar a resina impregnada com níquel, enquanto as proteínas não desejadas se ligam fracamente a resina, sendo consequentemente removidas pela lavagem com baixas concentrações de imidazol. Para eluição da proteína de interesse, aplica-se uma concentração alta de imidazol.

4.4.1. Purificação das proteínas expressas pelo vetor pAE

A purificação das três proteínas foi feita da fração insolúvel quando expressa pelo vetor pAE. A solubilização foi feita em tampão de desnaturação, contendo 8M ureia, subsequentemente removida. O sistema utilizado para purificação das proteínas foi o

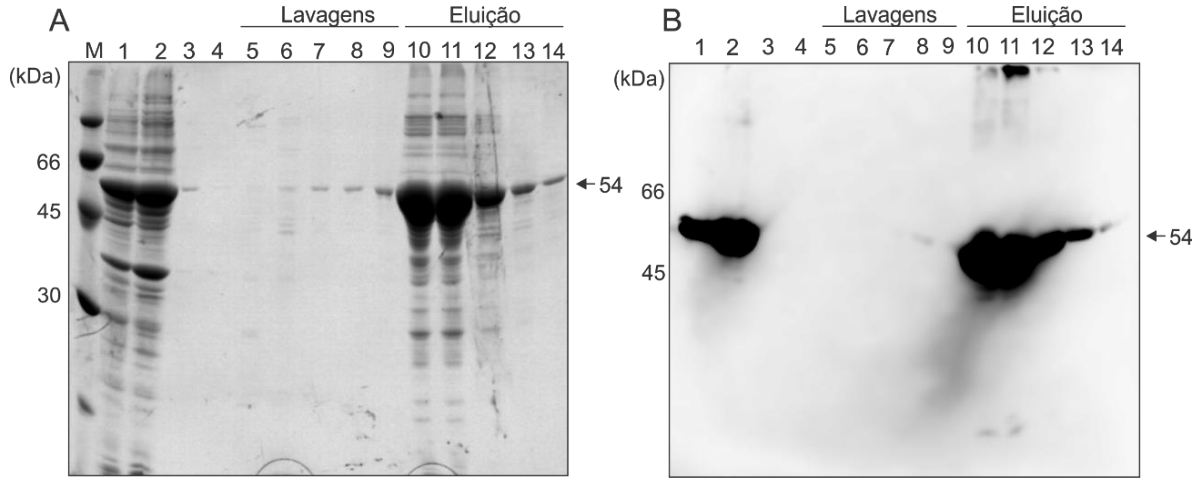
de diluição por gotejamento em tampão de *refolding*, seguido por *refolding* na coluna, utilizando concentrações decrescentes de ureia para renaturação da proteína para rLIC11111 e purificação com *Chelating Sepharose* para rLIC11112 e rLIC20143. As bandas correspondentes as proteínas purificadas rLIC11111, rLIC11112 e rLIC20143 podem ser vistas nas **Figura *30*Figura *31*Figura 32**, respectivamente. É nítido observar que a rLIC11111 apresentou pouco rendimento, uma vez que não se ligou muito bem a coluna. Já a rLIC11112 e rLIC20143 apresentaram quantidades satisfatórias de proteína purificada, tendo a rLIC11112 apresentado um rendimento aproximado de 7,5 mg/L e a rLIC20143 um rendimento em torno de 2,5 mg/L.

Figura 30 - Análise da purificação da proteína recombinante rLIC11111 expressa com o vetor pAE



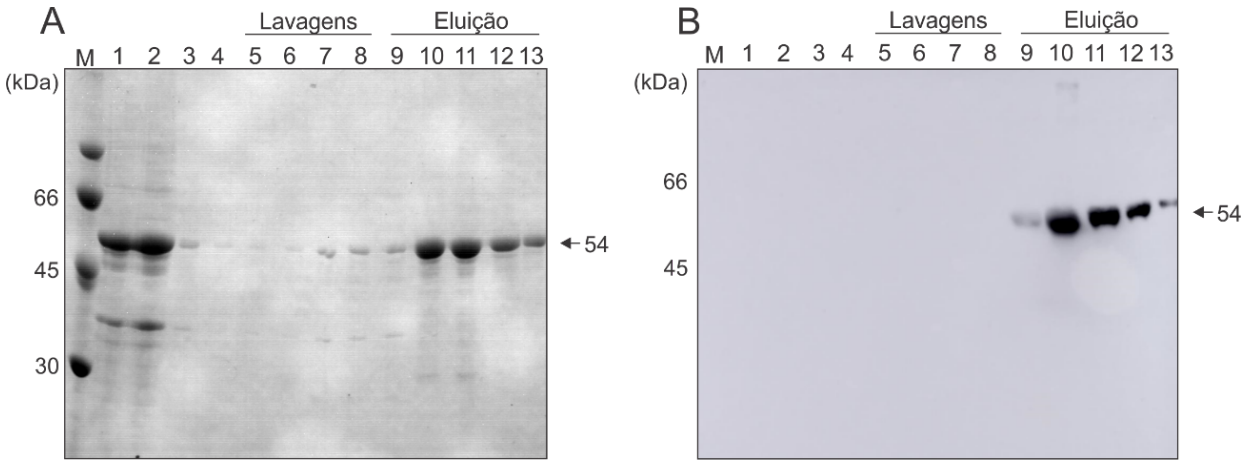
Géis do teste de expressão **(A)** Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie **(B)** *Western Blotting: a*s frações foram aplicadas a um gel SDS-PAGE 12% e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-His conjugado com peroxidase (1:10.000). M: padrão de massa molecular. 1: fração anterior a passagem na coluna; 2: fração não ligada; 3: 5 mM imidazol; 4: 20 mM imidazol; 5: 40 mM imidazol; 6: 60 mM imidazol; 7-14: frações de eluição com 1 M de imidazol.

Figura 31 - Análise da purificação da proteína recombinante rLIC11112 expressa com o vetor pAE



Géis do teste de expressão **(A)** Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie **(B)** *Western Blotting: a*s frações foram aplicadas a um gel SDS-PAGE 12% e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-His conjugado com peroxidase (1:10.000). M: padrão de massa molecular; 1 e 2: fração anterior a passagem na coluna; 3: fração pós gotejamento em tampão de *refolding*; 4: fração não ligada; 5: 5 mM imidazole; 6: 20 mM imidazol; 7: 40 mM imidazol; 8: 60 mM imidazol; 9-14: Frações de eluição com 1 M de imidazol.

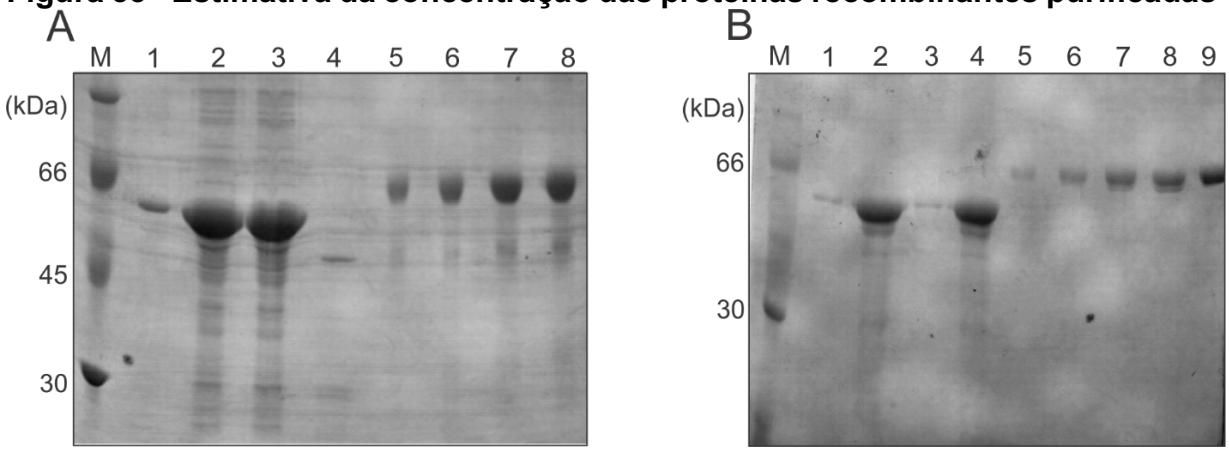
Figura 32 - Análise da purificação da proteína recombinante rLIC20143 expressa com o vetor pAE



Géis do teste de expressão **(A)** Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie **(B)** *Western Blotting: a*s frações foram aplicadas a um gel SDS-PAGE 12% e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-His conjugado com peroxidase (1:10.000). M: padrão de massa molecular. 1: fração anterior a passagem na coluna em ureia 1 hora; 2: fração anterior a passagem na coluna 16 horas; 3: fração diluída 20x em tampão Tris-NaCl anterior a passagem na coluna; 4: fração não ligada 5: 5 mM imidazol; 6: 20 mM imidazol; 7: 40 mM imidazol; 8: 60 mM imidazol; 9-13: frações de eluição com 1 M de imidazol.

Após a purificação, foi feita uma diálise em tampão 10 mM Tris e 150 mM NaCl e a concentração estimada em gel SDS-PAGE 12% (**Figura *33***A). As concentrações foram de 0,58 µg/µL (alíquota concentrada) e 0,12 µg/µL (alíquota diluída) para rLIC11112 e 0,08 µg/µL para rLIC11111. A **Figura *33***B mostra que a rLIC20143 com uma fração diluída de 0,1 µg/µL e uma fração concentrada 0,5 µg/µL.

Figura 33 - Estimativa da concentração das proteínas recombinantes purificadas



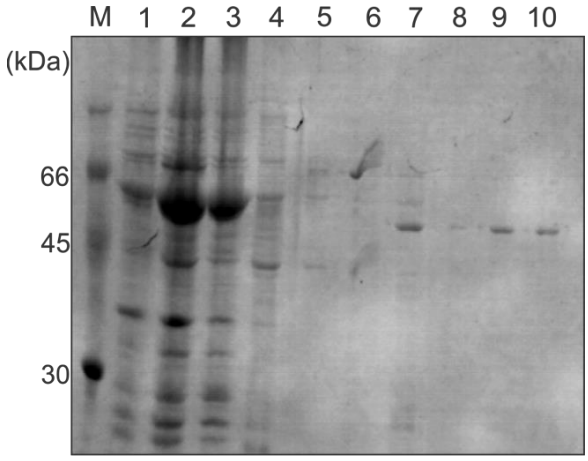
As proteínas recombinantes purificadas foram dialisadas, separadas por SDS-PAGE 12% e coradas com azul de Coomassie. As concentrações foram estimadas por comparação com massas conhecidas de BSA. **(A)** M: padrão de massa molecular. 1: fração da rLIC11112 diluída; 2 e 3: fração da rLIC11112 concentrada; 3: fração da rLIC11111; 5, 6, 7 e 8: massas conhecidas de BSA em microgramas (1, 2, 3 e 4, respectivamente). **(B)** M: padrão de massa molecular. 1 e 3: fração alíquota diluída rLIC20143; 2 e 4: fração alíquota concentrada rLI20143; 5, 6, 7, 8 e 9: massas conhecidas de BSA em microgramas (0,5, 1, 2, 3 e 4, respectivamente).

4.4.2. Purificação das proteínas expressas pelo vetor pET-SUMO

Para obtenção das proteínas de interesse rLIC11111 e rLIC11112, 1 L de meio de cultura foi utilizado para indução de *E. coli* estirpe BL21 (DE3) pGro7 a 18 ºC por 18 horas. Após a lise celular, a fração solúvel (sobrenadante) foi submetida ao método de cromatografia de afinidade. Esse vetor produz a proteína de interesse fusionada a proteína SUMO que deve ser clivada, para tal, a proteína purificada foi incubada por 12 horas com a enzima ULP1 (*Ubiquitin-like-specific protease* 1). Após a clivagem, a amostra foi concentrada até um volume final de 3 mL, sendo então submetida a uma cromatografia de exclusão por tamanho para separar a proteína recombinante da SUMO e da enzima (**Figura *34*Figura 35**). É possível observar segundo a **Figura *34***

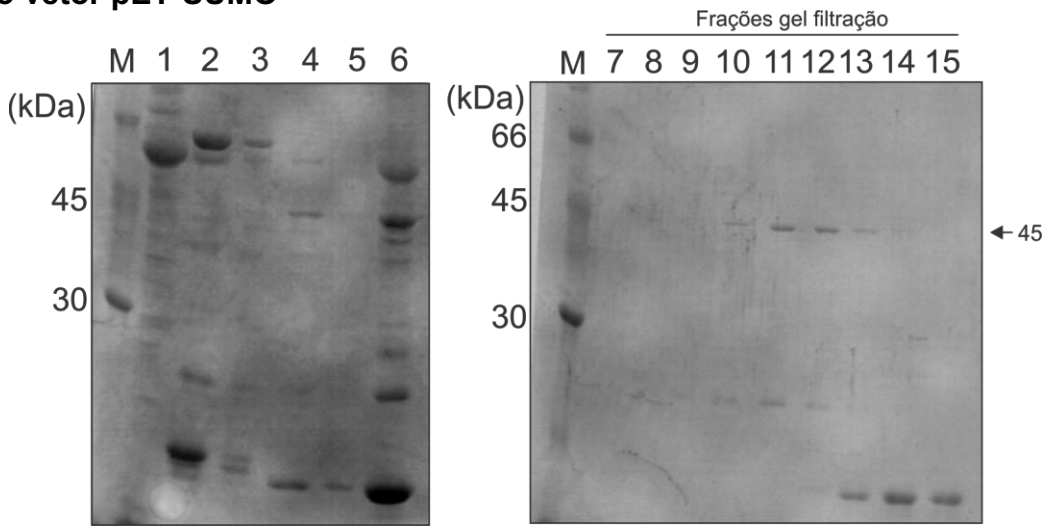
que a rLIC11112 foi eluída nas frações 8, 9 e 10. Já a proteína rLIC11111 nas frações 10, 11, 12 e 13 (**Figura *35***).

Figura 34 - Análise da purificação da proteína recombinante rLIC11112 expressa com o vetor pET-SUMO



Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie. M: padrão de massa molecular; 1: fração não induzida; 2: fração anterior a passagem na coluna 3: fração não ligada; 4: 20 mM imidazol; 5: 60 mM imidazol; 6: 1M imidazol; 7 – 10: frações purificadas pós clivagem com ULP1 passadas em coluna de exclusão por tamanho.

Figura 35 - Análise da purificação da proteína recombinante rLIC11111 expressa com o vetor pET-SUMO



Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie. M: padrão de massa molecular; 1: fração não induzida; 2: fração solúvel anterior a passagem na coluna 3: fração não ligada; 4: 20 mM imidazol; 5: 60 mM imidazol; 6: 1M imidazol concentrada; 7 – 15: frações purificadas pós clivagem com ULP1 passadas em coluna de exclusão por tamanho.

4.5. Dicroísmo Circular

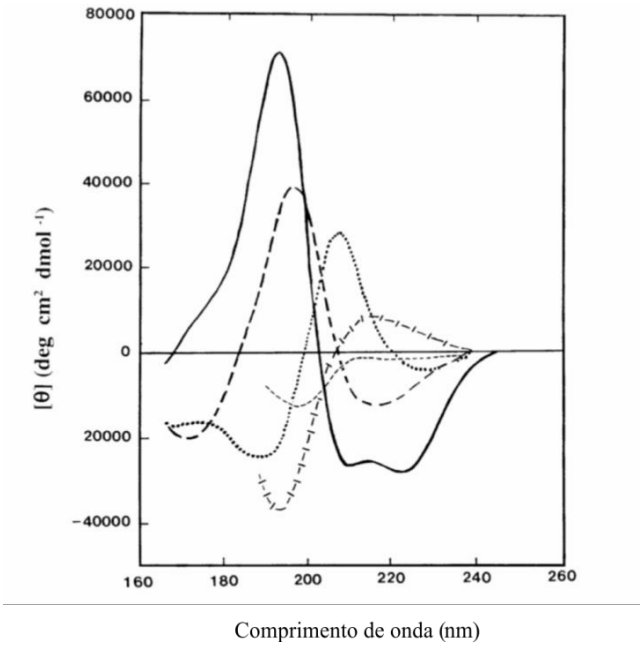
O conhecimento das estruturas proteicas é importante para compreender suas

funções (VAN STOKKUM et al., 1990). A espectroscopia de dicroísmo circular (DC) é uma ferramenta biofísica bem estabelecida capaz de caracterizar estruturas secundárias proteicas e ácidos nucleicos (MILES; WALLACE, 2016). Esse método é definido como a absorção desigual da luz polarizada circularmente, quando moléculas assimétricas interagem com a luz elas a absorvem (GREENFIELD, 2006).

As proteínas que contêm α-hélice na sua estrutura apresentam picos negativos a 222 nm e 208 nm e um pico positivo a 193 nm. As proteínas com folhas β antiparalelas têm um pico negativo a 218 nm e um positivo a 195 nm, enquanto as proteínas desordenadas apresentam um sinal muito baixo acima de 210 nm e picos negativos próximas de 195 nm (**Figura *36***) (GREENFIELD, 2006).

Apenas os resultados para a proteína recombinante LIC111112 expressa pelo sistema pAE e purificada da fração insolúvel foram satisfatórios. Para tal, a proteína foi dialisada em uma solução tampão sódio-fosfato 10 mM (pH 7,4) a 4ºC e mantida sob refrigeração até o momento da análise no espectropolarímetro. A curva gerada pela análise pode ser vista na **Figura *37***, a fim de comparação uma curva padrão também pode ser observada na **Figura *36*** (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

Figura 36 - Espectros característicos de estruturas secundárias



Espectros de UV de DC associados a diferentes tipos de estrutura secundária. Linha sólida, α-hélice; linha pontilhada longa, folha β anti-paralela; linha pontilhada, β turn tipo I; linha tracejada cruzada, hélice poli (Pro) II; linha tracejada curta, estrutura irregular.

Fonte: Adaptado de KELLY; JESS; PRICE (2005).

Figura 37 - Espectros gerados pela análise de dicroísmo circular para a proteína recombinante LIC11112

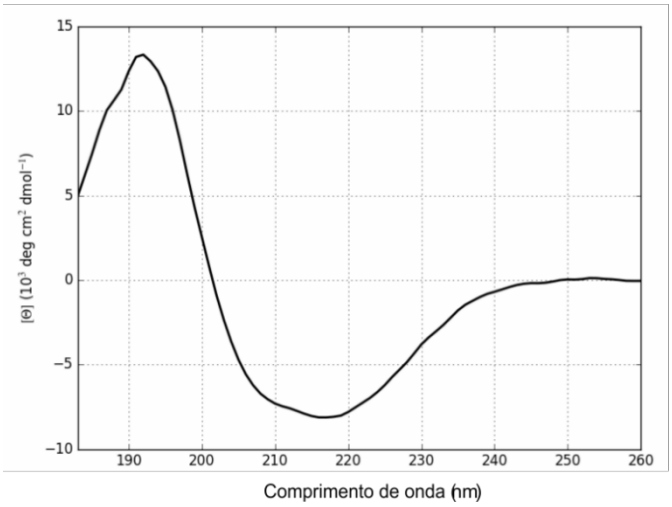


Gráfico gerado pelo programa CAPITO (WIEDEMANN; BELLSTEDT; GÖRLACH, 2013) com base nas estruturas secundárias experimentais da rLIC11112.

Os espectros de dicroísmo circular, quando comparados com a curva padrão, permitiram obter sinais característicos das estruturas secundárias, revelando presença tanto de α-hélice, quanto de folha-β na rLIC11112. Os valores preditos baseados na sequência de aminoácidos gerados pelo CAPITO encontram-se na **Tabela 2**. É possível observar que os valores experimentais confirmaram a predominância de folha-β. Esses dados indicam que mesmo a proteína tendo sido desnaturada e renaturada ela foi capaz de formar estruturas secundárias novamente, mas que não necessariamente reflete a conformação nativa das proteínas.

No que tange as proteínas LIC11111 e a LIC20143, as condições necessárias para análise não permitiram a realização deste experimento, uma vez que as proteínas precipitavam.

Tabela 2 - Análise dos espectros do CD e da predição com base na sequência de aminoácidos obtidos pelo programa CAPITO

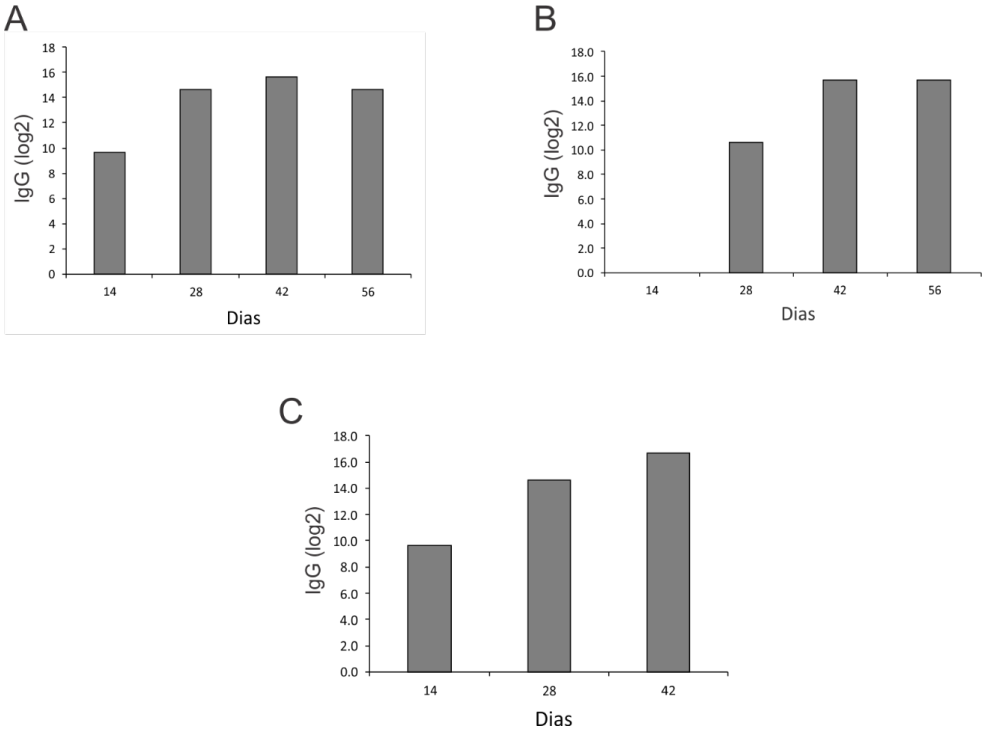
	α-hélice	**Folha β**	**Irregular**
Predito (%)	18	37	45
Experimental (%)	6	47	52

4.6. Avaliações imunológicas

Camundongos BALB/c foram imunizados pela via subcutânea com 10 µg de cada proteína recombinante, tendo *Alhydrogel* (2% Al(OH)3) como adjuvante, em intervalos de 14 dias. Os soros obtidos foram avaliados quanto à presença de anticorpos anti-rLIC11112, rLIC1111 e rLIC20143. Os títulos de anticorpos policlonais presentes no soro dos animais de cada grupo foram avaliados por ELISA.

O grupo imunizado com a rLIC11111 (**Figura *38***A) após a primeira imunização já foi possível observar títulos de IgG, tendo seu ápice na terceira sangria com o valor de 51.200. Já o grupo imunizado com a proteína rLIC11112 só apresentou títulos de anticorpos após a segunda dose, entretanto ao fim da terceira imunização foi possível observar uma manutenção de, pelo menos, duas semanas do título (**Figura *38***B), sendo o valor do título obtido de 51.200, o mesmo da rLIC11111. O grupo imunizado com a rLIC20143 (**Figura *38***C) apresentou anticorpos crescentes a partir da primeira imunização, tendo um título de aproximadamente 150.000. O grupo controle (coleta dos soros pré imunização) não apresentou quaisquer títulos (dados não mostrados).

Figura 38 - Produção de anticorpos IgG pela imunização de camundongos com as proteínas recombinantes LIC11111, LIC11112 e LIC20143

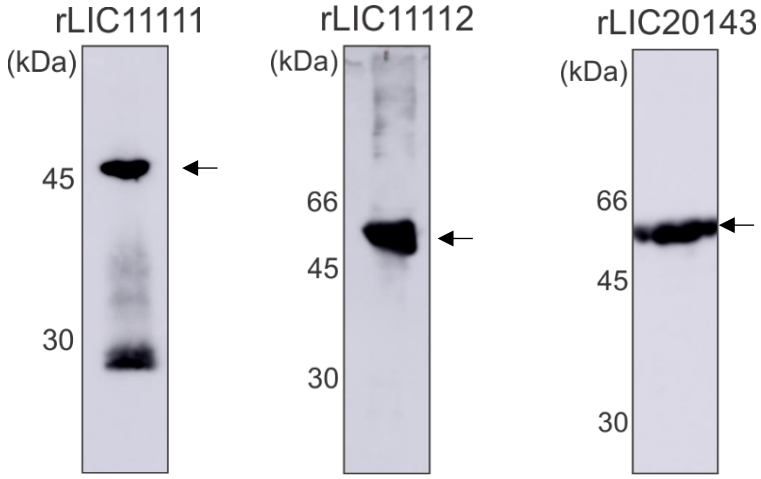


Quinze dias após cada imunização, os animais foram sangrados e foi feita a detecção de anticorpos IgG anti-proteína recombinante. As proteínas foram imobilizadas em placas de

ELISA (250 ng de proteína/poço) e então foram adicionadas diluições seriadas do antissoro aos poços. Após incubação, a detecção do sinal foi feita por incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5.000). As barras indicam a média do log2 do título dos animais. A: rLIC1111; B: rLIC11112; C: rLIC20143.

Para demonstrar o reconhecimento das proteínas recombinantes pelos anticorpos policlonais anti-LIC11111, anti-rLIC11112 e anti-rLIC20143, realizou-se um ensaio de *western blotting* no qual foi possível observar o reconhecimento do anticorpo com a proteína recombinante (**Figura *39***). Após a realização dos ensaios de imunização, não foi possível purificar a proteína rLIC11111 novamente, várias metodologias foram empregadas, mas sem sucesso. Dessa maneira, não foram realizados mais experimentos que necessitasse da proteína recombinante LIC11111.

Figura 39 - Análise das proteínas recombinantes por *western Blotting* utilizando o antissoro policlonal anti-LIC11111, anti-rLIC11112 e anti-rLIC20143



As amostras foram aplicadas em SDS-PAGE 12%, transferida para membrana de nitrocelulose e incubada com o antissoro anti-rLIC11111 (1:2.000), anti-rLIC11112 (1:2.000) e anti-rLIC20143 (1:5.000).

4.7. Reatividade com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose

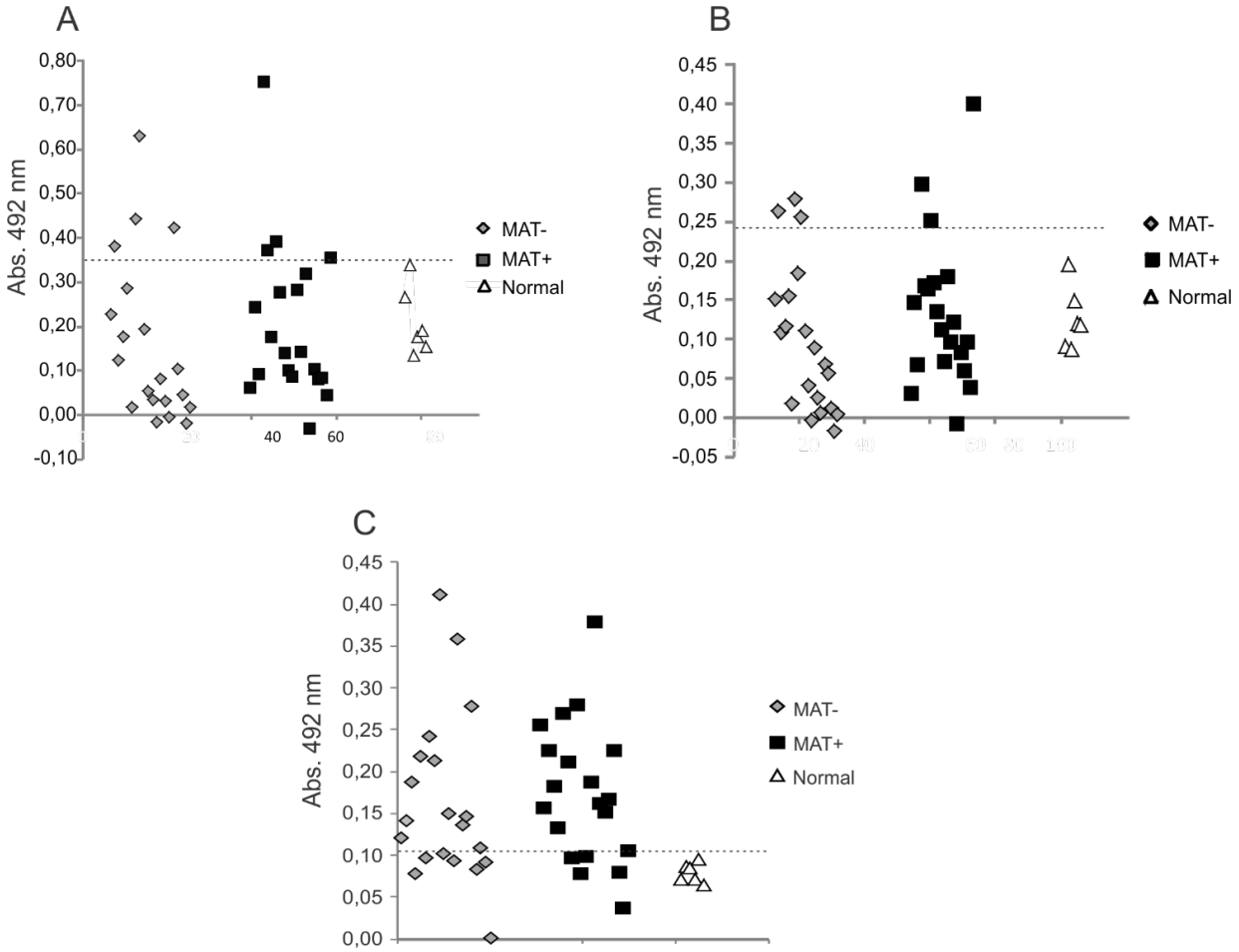
A fim de identificar se as proteínas estudadas são expressas durante a infecção, além de avaliar o potencial das proteínas recombinantes na composição de um possível kit diagnóstico, foi avaliada sua reatividade com soros pareados (n=20, fase convalescente, MAT+ e fase inicial, MAT-) de pacientes diagnosticados com leptospirose.

O teste de microaglutinação (MAT) é o método referência para dignóstico da leptospirose. Entretanto é uma técnica que apresenta baixa sensibilidade na fase inicial da doença, já que anticorpos contra antígenos da *Leptospira* não são detectados nos primeiros dias após a exposição (BAJANI et al., 2003; CUMBERLAND; EVERARD; LEVETT, 1999; HULL-JACKSON et al., 2006; PLANK; DEAN, 2000). Além disso, por se tratar de um ensaio sorovar específico, os laboratórios que realizam MAT necessitam manter culturas vivas de diferentes sorovares de *Leptospira* (LEVETT, 2003), o que dificulta a execução do ensaio.

Diversos trabalhos buscam por proteínas que tenham a capacidade de serem reconhecidas na fase inicial da doença (CHEN et al., 2013, 2018; FLANNERY et al., 2001; GHOSH et al., 2018; SEENICHAMY et al., 2014). Antígenos de *Leptospira* spp. como as proteínas Lp29 (NEVES et al., 2007), MPL17 e MPL21 (OLIVEIRA et al., 2008), Lsa25.6 e Lsa16 (PEREIRA et al., 2017), podem facilitar o diagnóstico precoce da doença e por conseguinte seu tratamento.

A reatividade com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose foi de 20% em MAT- e de 25% em MAT+ para rLIC11111 (valor *cutoff* calculado de 0,34) (**Figura *40***A), de 15% tanto na fase MAT+ quanto MAT- para rLIC11112 (valor *cutoff* calculado de 0,24) (**Figura *40***B) e para rLIC20143 a reatividade foi de 60% tanto em MAT- quanto em MAT+ (valor de *cutoff* foi calculado em 0,11) (**Figura *40***C). Esses dados sugerem que as três proteínas estudadas podem ser expressas durante a infecção, entretanto a rLIC11111 e rLIC11112 não seriam boas candidatas como proteínas diagnósticas. Já a rLIC20143 apresentou um bom reconhecimento na fase inicial da doença, sendo uma proteína interessante para se fazer mais estudos e um possível kit diagnóstico, talvez num formato de proteína quimérica, combinada com outras proteínas já descritas com potencial diagnóstico (FERNANDES et al., 2017).

Figura 40 - Reatividade das proteínas recombinantes com amostras de soro humano infectados com leptospirose



As proteínas rLIC1111 (A) e rLIC11112 (B) foram imobilizadas em placa de ELISA (250 ng/poço) e a proteína rLIC20143 (C) imobilizada com 500 ng/poço e então incubadas com soro pareados de pacientes diagnosticados com leptospirose, na fase convalescente (MAT+) e aguda (MAT-), na diluição de 1:100. A detecção da reatividade foi feita por incubação com anti-IgG humano conjugado com peroxidase (1:5.000). Os respondedores são considerados como aqueles acima do valor *cutoff* (linha horizontal pontilhada), definida como a média somada a três vezes o desvio padrão de 6 indivíduos normais.

4.8. Ensaio enzimático

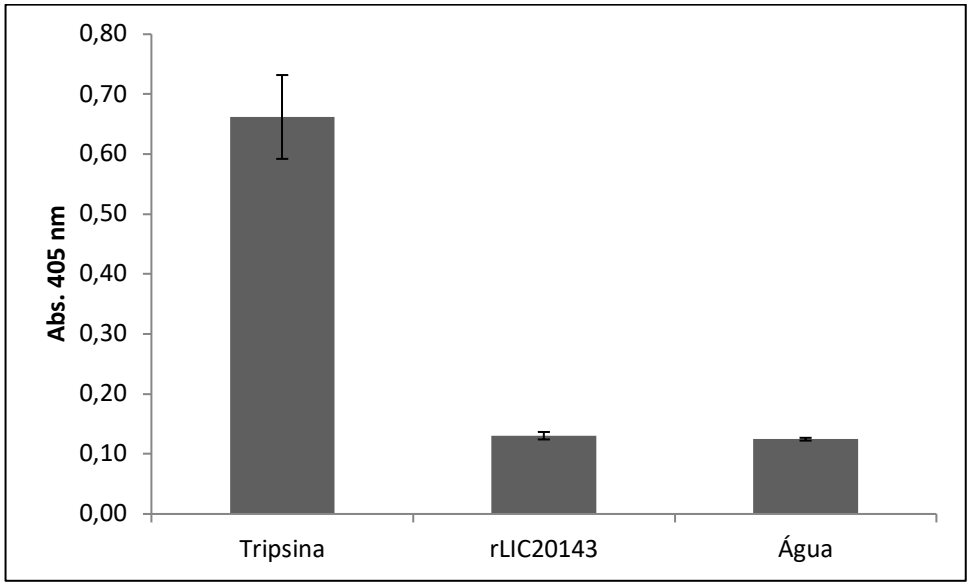
HtrA de *B. burgdorferi* (HtrABb) é capaz de degradar seletivamente várias proteínas endógenas. O primeiro substrato identificado foi o fator de virulência BB0323 (ZHANG et al., 2009). Tambem foi demonstrada como substrato da HtrABb a proteína D de membrana básica (BmpD/BB0385), a fosfatase CheX de quimiotaxia (BB0671) e a proteína integral de membrana externa P66 (COLEMAN et al., 2013).

O HtrABb promove a invasão por meio da degradação dos componentes da matriz extracelular agrecan (RUSSELL; JOHNSON, 2013) e fibronectina (RUSSELL; DELOREY; JOHNSON, 2013). HOY et al., (2010, 2012) demonstraram que o HtrA de

H. pylori extracelular é capaz de clivar a E-caderina supressora tumoral das células epiteliais gástricas. A proteína fibronectina da matriz extracelular também foi identificada como um substratoda HtrA *de H. pylori* (HOY et al., 2010).

Dessa maneira, a fim de investigar se a proteína recombinante LIC20143 é capaz de apresentar atividade enzimática foram realizados três ensaios com diferentes abordagens. L-Bapa, um subtrato cromogênico para tripsina, foi utilizado nesse ensaio. O ensaio foi realizado em triplicata e em dois ensaios independentes. De acordo com a **Figura *41*** é possível observar que não a rLIC20143 não apresentou atividade enzimática, assim como o branco (água). Enquanto a tripsina, controle positivo, foi capaz de degradar o substrato.

Figura 41 - Ensaio de degradação do substrato cromogênico para tripsina L-BAPA

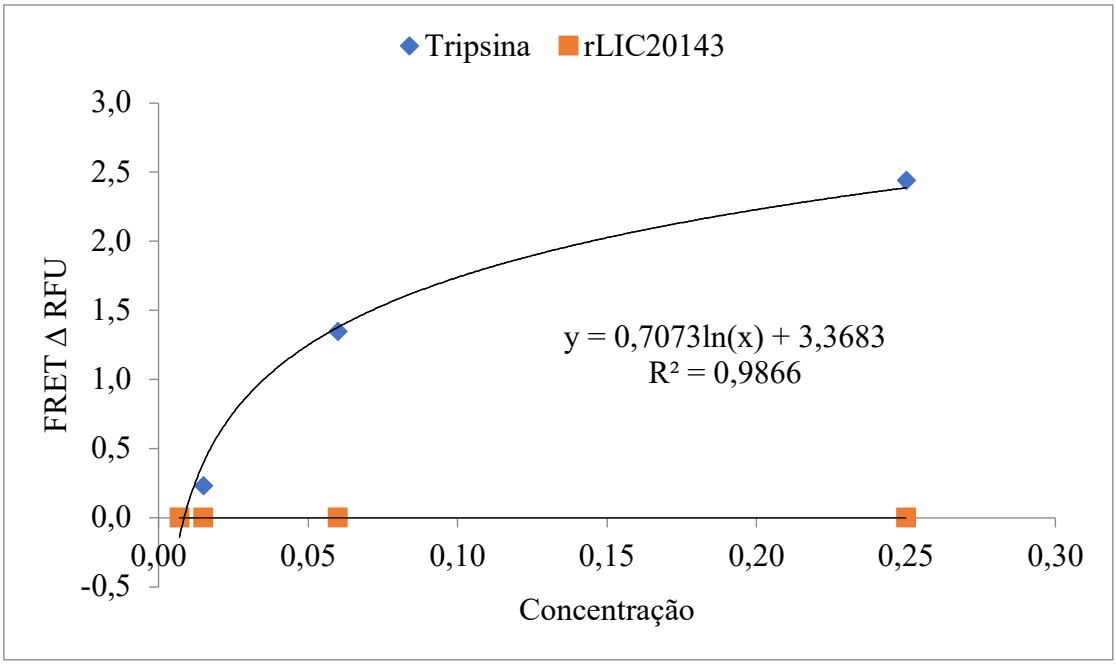


Tripsina, rLIC20143 e água foram incubados com L-BAPA por 2h a 37 ºC. Após esse período a reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% e então a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 405 nm.

Além do substrato L-BAPA, também foi utilizado o Pierce Fluorescent Protease Assay Kit (ThermoFisher), que consiste em caseína marcada com fluoresceína para uso como substrato a fim de avaliar a atividade de protease em uma amostra por transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET). A medição baseada em FRET detecta a diminuição na extinção de fluorescência (= fluorescência total aumentada) que ocorre conforme o substrato FTC-Caseína é digerido em fragmentos menores marcados com fluoresceína.

O ensaio foi feito incubando tripsina, rLIC20143 e tampão TBS em placas de 96 poços e adicionado a eles o substrato FTC-caseína. Após incubação, a leitura foi realizada utilizando no aparelho Fluoroskan Ascent FL, utilizando os filtros 485/538 nm. A **Figura *42*** mostra que a rLIC20143 não apresentou uma atividade enzimática, uma vez que não foi detectada mudança na fluorescência, enquanto a tripsina teve maior fluorescência conforme a concentração foi aumentada.

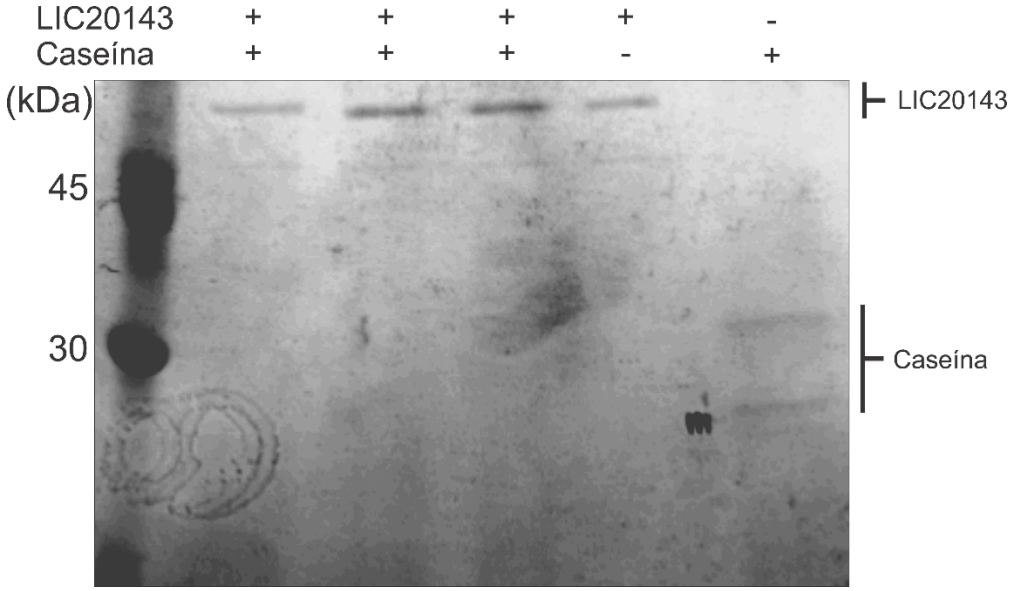
Figura 42 - Ensaio de degradação do substrato fluorescente FTC-caseína



Foram adicionados 50 µL de controle positivo (tripsina), controle negativo (somente tampão TBS) e proteína rLIC20143 em placas de 96 poços e adicionado a eles 50 µL do substrato FTC-caseína. Foi incubado em temperatura ambiente por 60 minutos. A leitura da fluorescência foi realizada utilizando o aparelho Fluoroskan Ascent FL, utilizando os filtros 485/538 nm.

Uma terceira estratégia foi empregada para avaliar o papel proteolítico da rLIC20143. Foi realizado um ensaio de degradação de caseína, onde a rLIC20143 foi incubada com a caseína total por 2 horas a 37 ºC em triplicata, tendo controles só com proteína e só com a caseína, e então submetida a eletroforese de SDS-PAGE. A **Figura *43*** mostra que a proteína foi capaz de degradar a caseína quando encubada por 16 horas a 37 °C, uma vez que no controle sem a proteína, a caseína se manteve íntegra. Só foram feitos os experimentos de atividade com a rLIC20143 por ela ser uma HtrA completa, apresentando a região de serino-protease e do PDZ.

Figura 43 - Degradação da caseína pela proteína recombinante rLIC20143

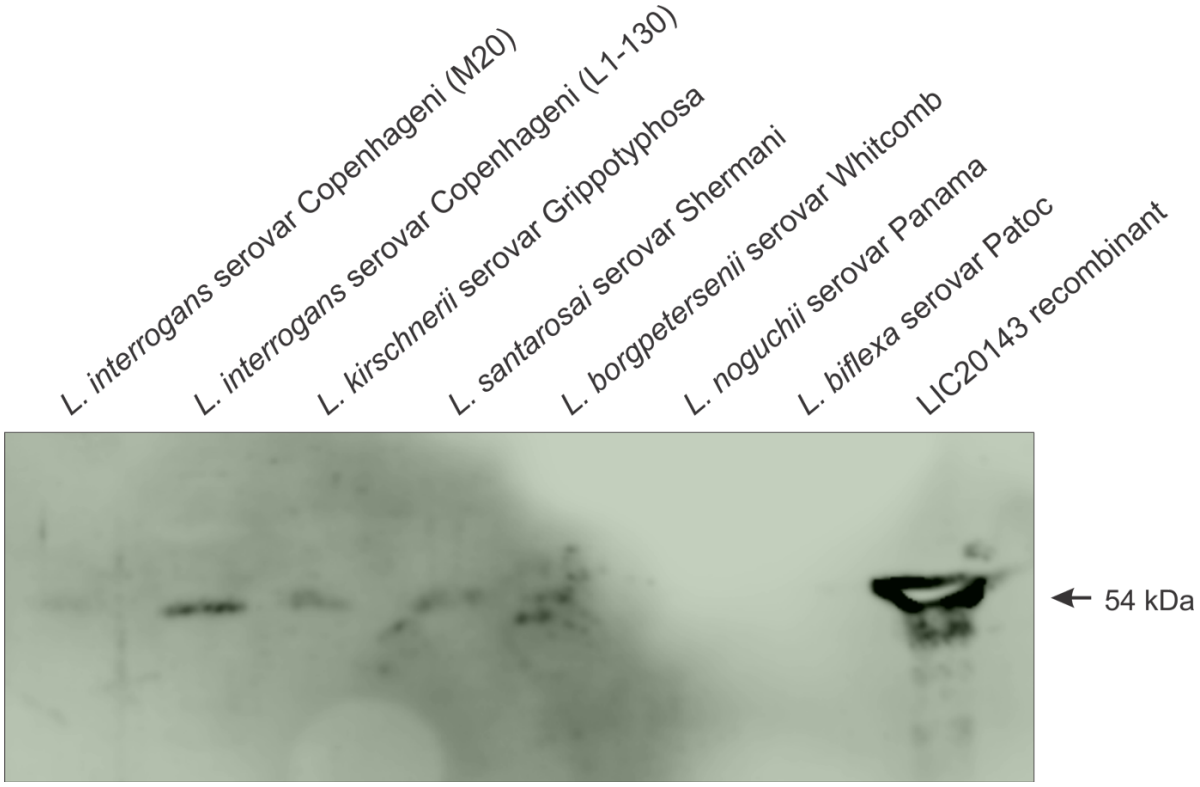


Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie mostrando a degradação de caseína pela proteína recombinante rLIC20143.

4.9. Ensaio de conservação da LIC20143 frente a diferentes estirpes de *Leptospira*

Foi avaliada a presença da proteína codificada pelo gene da LIC20143 em extratos celulares de diferentes estirpes de *Leptospira*, mencionada no item 3.1. É possível observar pela **Figura *44*** que houve detecção da proteína em diferentes extratos bacterianos. Todas as estirpes usadas são patogénicas, com exceção da *L. biflexa* (saprofítica). O reconhecimento foi observado em todas as patogénicas, menos na *L. noguchii* sorovar Panama. A *L. biflexa* também não apresentou interação com o antissoro anti-rLIC201143, mesmo tendo uma proteína anotada com 54% de similaridade. Isso demonstra uma alta conservação entre as estirpes patogênicas. Vale ressaltar também o maior sinal detectado pela L1-130, a forma virulenta da *L. interrogans*, contrastando com o sinal mais fraco da M20, a forma atenuada em cultura. Isso pode indicar que essa proteína tenha uma expressão mais acentuada na virulenta, o que pode, de alguma maneira, contribuir para o processo de infecção. A LIC11112 e LIC11111 não foram detectadas em extratos celulares, provavelmente por apresentarem menos cópias da proteína por célula, conforme quantificado por Malmström et al., (2009).

Figura 44 - Análise da conservação da LIC20143 em diferentes espécies de *Leptospira*



Extratos de bactérias após lise celular foram submetidas ao SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A proteína codificada pelo gene da LIC20143 foi detectada utilizando o antissoro produzido contra a proteína recombinante e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. A proteína possui um peso molecular de 54kDa.

4.10. Localização celular da proteína codificada pelo gene da LIC20143

Para uma proteína ser considerada um bom candidato vacinal para a leptospirose, deve-se levar rem consideração a localização celular da proteína e a conservação em várias espécies e estirpes de *Leptospira*. Proteínas de membrana externa ou exportada são principais alvos vacinais, já que elas devem estar acessíveis para o reconhecimento de anticorpos, levando ao impedimento da disseminação da doença. Dessa forma, dois ensaios de localização celular foram realizados: imunofluorescência e imunoensaio por ELISA, descritos abaixo.

4.10.1.Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência possibilita a detecção das proteínas nativas na superfície da *Leptospira* por meio do reconhecimento com anticorpo específico

conjugado com fluoróforo, que é excitado e emite fluorescência em um comprimento de onda específico.

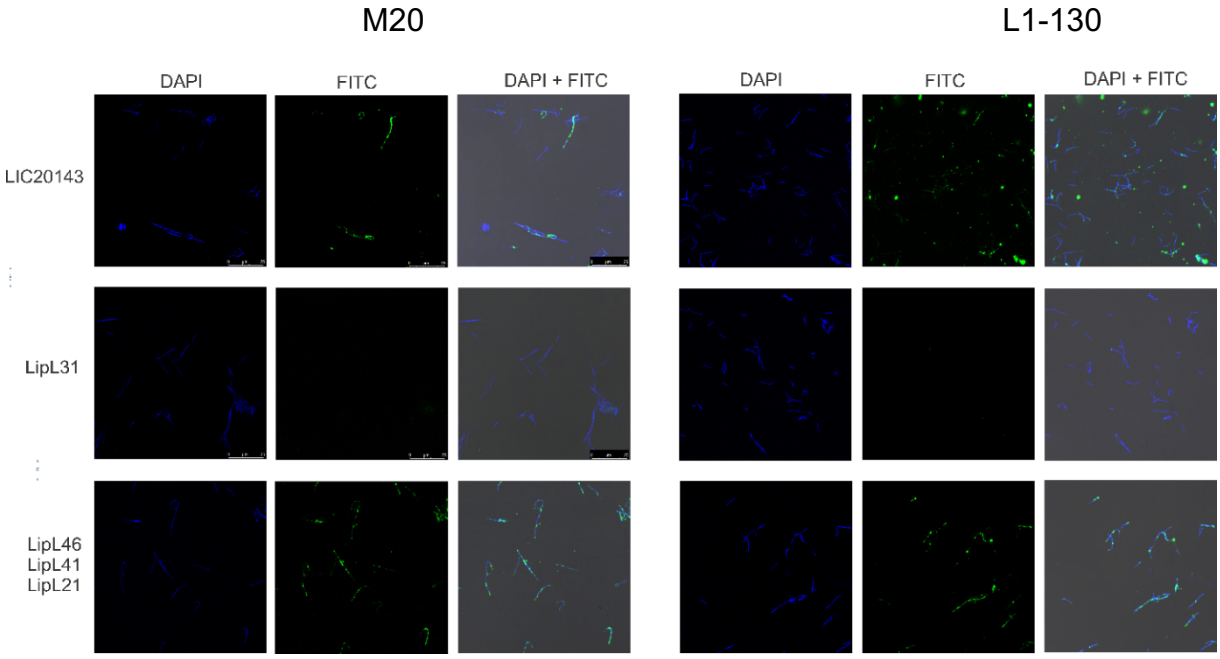
As leptospiras, após serem fixadas em lâminas com paraformaldeído, foram incubadas com os antissoros contra as proteínas recombinantes. Para a visualização das proteínas detectadas pelo antissoro foi utilizado anti-IgG conjugado com FITC. DAPI foi utlizado para marcar o material genético da *Leptospira*, permitindo a visualização em azul. As imagens sobrepostas (DAPI+FITC) permite observar a presença das proteínas marcadas na *Leptospira*.

Foi utilizado um "*pool*" de antissoros contra as proteínas LipL46, LipL41 e LipL21 como controle positivo, pois ela são descritas como proteínas de membrana externa (CULLEN et al., 2003; MATSUNAGA et al., 2006; SANTOS et al., 2018; SHANG; SUMMERS; HAAKE, 1996). Como controle negativo, foi utlizado o antissoro contra a proteína LipL31, já descrita como proteína de membrana citoplasmática (HAAKE; MATSUNAGA, 2002).

De acordo com a **Figura *45***, observa-se que no tratamento com o antissoro anti-LIC20143 foi verificado sinal de fluorescência no comprimento de onda da cor verde, sugerindo que a proteína foi marcada com FITC. A sobreposição das imagens da marcação com FITC e DAPI garante a que havia viabilidade celular.

Como esperado, não houve marcação com FITC para proteína LipL31, uma vez que essa proteína se encontra no interior da célula. Já o "pool" de soros utilizado para o controle positivo mostrou uma alta fluorescência, já que todas são proteínas de membrana externa. Os resultados obtidos sugerem que a proteína rLIC20143 está sendo expressa na superfície da *L. interrogans* serovar Copenhageni M20 (atenuada em cultura) e L1-130 (virulenta) (**Figura *45***).

Figura 45 - Localização celular da rLIC20143 em *L. interrogans* virulenta e atenuada em cultura pela técnica de imunofluorescência

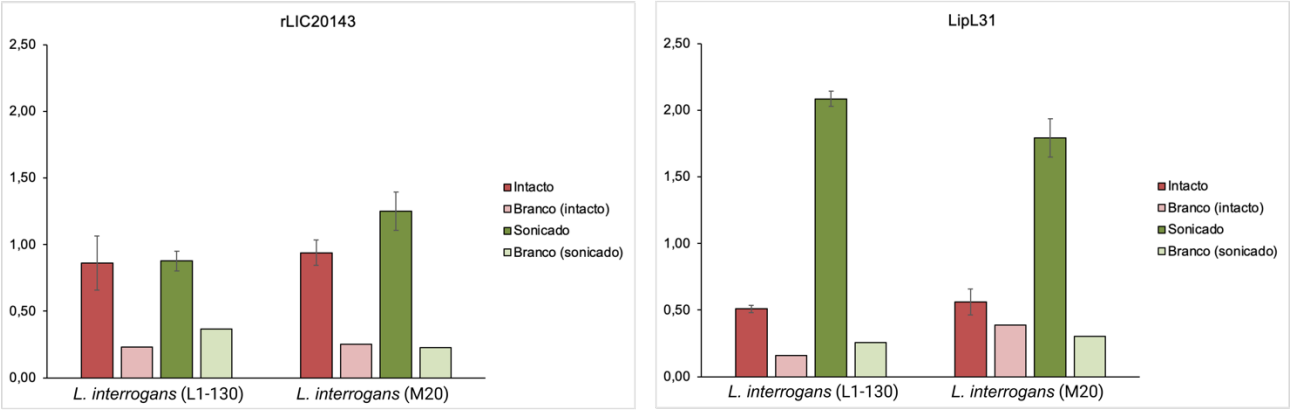


L. interrogans serovar Copenhageni estirpe M20 (atenuada em cultura) e L1-130 (virulenta) oi fixada com paraformaldeído e incubada com antissoro anti-rLIC20143, um "pool" de anti-LipL46, anti-LipL41 e anti-LipL21 (controle positivos, proteínas expostas) ou anti-LipL31 (controle negativo). DAPI e anticorpo secundário conjugado ao FITC foram adicionados para identificar DNA leptospiral e proteínas de membrana, respectivamente. Localização celular está demonstrada nas imagens sobrepostas (DAPI + FITC).

4.10.2.ELISA

Um imunoensaio por ELISA foi realizado utilizando as bactérias na forma intacta (membrana íntegra) e sonicada (citosol exposto). Neste ensaio, as estirpes patogênicas M20 (atenuada) e L1-130 (virulenta) de *L. interrogans* foram imobilizadas em placa de ELISA e a detecção foi feita com antissoro homólogo gerado contra as proteínas recombinantes (**Figura *46***).

Figura 46 - Localização por ELISA utilizando *L. interrogans* intacta e lisada



Para a detecção as bactérias (intacta e sonicada) foram incubadas em placas de ELISA, em seguida foi utlizado soro anti-rLIC20143 e anti-LipL31 (controle negativo) recombinante produzidos em camundongos para reconhecimento das proteínas e em seguido foi adicionado o anticorpo secundário IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase para detecção da absorbância.

Os resultados obtidos demonstram uma detecção das proteínas tanto na bactéria intacta quanto na sonicada (citossol exposto), com um sinal ligeiramente maior na estirpe atenuada do que na estirpe virulenta, o que é diferente do resultado obtido para o ensaio de conservação descrito na sessão 4.9. Entretanto, quando comparado como controle negativo (LipL31) os resultados para a rLIC20132 foram os esperados, uma vez que a LipL31 é descrita como proteína de membrana citoplasmática (HAAKE; MATSUNAGA, 2002), então seu sinal é basal na bactéria intacta.

4.11. Adesão das proteínas rLIC11112 e rLIC20143 a componentes da matriz extracelular e plasma

4.11.1. Matriz extracelular

A adesão de patógenos aos tecidos do hospedeiro é um evento crítico na patogênese das infecções, uma vez que marca o contato inicial entre patógeno-hospedeiro (FERNANDES et al., 2016). Componentes específicos de microrganismos chamados de adesinas medeiam a adesão aos tecidos por meio de interações com moléculas do hospedeiro (LJUNGH; MORAN; WADSTRÖM, 1996).

A matriz extracelular (ECM) é um tecido biologicamente ativo composto por uma mistura complexa de macromoléculas, podendo servir tanto como substrato para a adesão das células ao hospedeiro quanto para interação com microrganismos

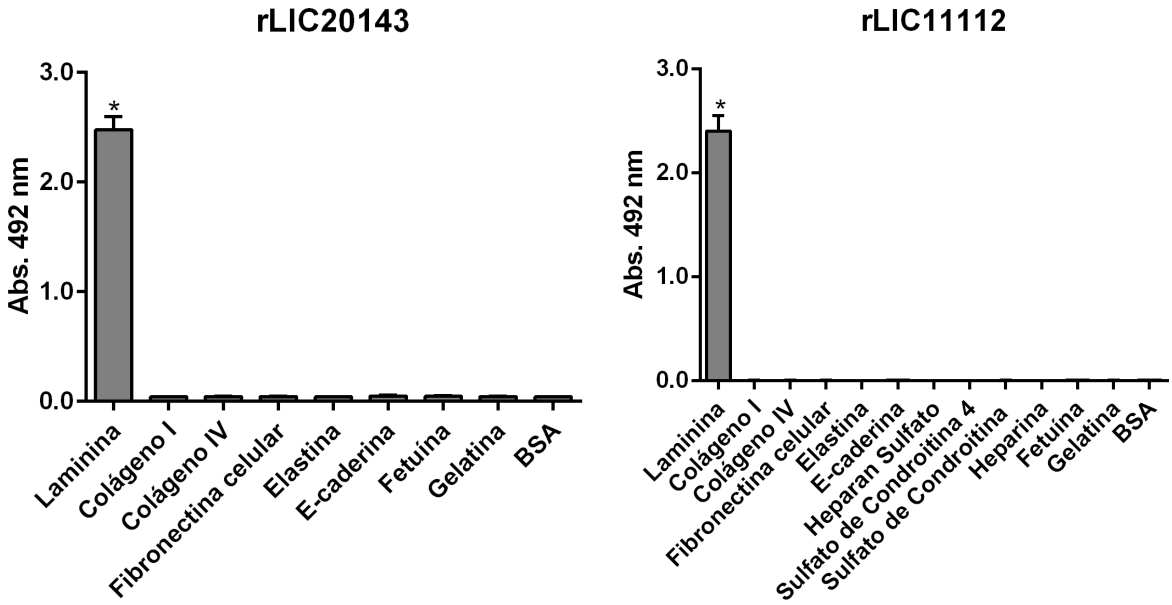
patogênicos (PATTI; HÖÖK, 1994). Laminina é uma glicoproteína de alta massa molecular, localizada principalmente na membrana basal na maioria das células, importante para diferenciação celular e adesão entre células (ROHDE; WICK; TIMPL, 1979; TIMPL et al., 1979); a elastina é um proteína que confere elasticidade aos tecidos, sendo presente principalmente em vasos sanguíneos, pulmões e pele (KRISTENSEN; KARSDAL, 2016); a fibronectina atua como regulador de diversos processos celulares e suporte para organização tecidual (TO; MIDWOOD, 2011); as caderinas são proteínas da superfície celular cuja função é manter a integridade célula-célula, ancorando as células vizinhas, sendo que a *L. interrogans* liga-se às células que revestem os vasos sanguíneos e à caderina do tipo VE, que é a caderina predominante encontrada neste tipo de célula, essa ligação pode causar danos celulares, facilitando o escape do patógeno da corrente sanguínea para diferentes tecidos (EVANGELISTA et al., 2014). Diversos microrganismos expressam adesinas em suas superfícies celulares que participam da ligação à matriz extracelular dos tecidos do hospedeiro.

A interação das leptospiras às células do hospedeiro e a componentes da matriz extracelular é necessária para que a bactéria consiga penetrar e disseminar-se, persistindo assim nos tecidos. Diversos trabalhos demonstrando essa interação foram descritos, como a proteína Lsa24 (BARBOSA et al., 2006) caracterizada pelo nosso grupo como ligante de laminina. Adesinas como LigA e LigB (CHOY et al., 2007), proteínas da família Len (STEVENSON et al., 2007), Lsa21 (ATZINGEN et al., 2008), LipL32 (HOKE et al., 2008), Lp95 (ATZINGEN et al., 2009), TlyC (CARVALHO et al., 2009), LipL53 (OLIVEIRA et al., 2010), OmpL37 (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010), Lsa63 (VIEIRA et al., 2010b), Lsa66 (OLIVEIRA et al., 2011), Lsa20 (MENDES et al., 2011), Lsa33 (DOMINGOS et al., 2012) e Lsa30 (SOUZA et al., 2012). As proteínas Lsa27 (LONGHI et al., 2009), Lsa20 (MENDES et al., 2011), Lsa25 e Lsa33 (DOMINGOS et al., 2012), Lsa26 (SIQUEIRA et al., 2013) são adesinas que se ligam somente a laminina. Outras proteínas também inclusas nessa categoria de ligantes aos componentes da matriz são: Lp95 (ATZINGEN et al., 2009), Lsa66 (OLIVEIRA et al., 2011), OmpL37, OmpL47 (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010), TlyC (CARVALHO et al., 2009), Lsa30 (SOUZA et al., 2012), Lsa23, Lsa36 (SIQUEIRA et al., 2013), Lsa44, Lsa45 (FERNANDES et al., 2014), Lsa32 (DOMINGOS et al., 2015), Lsa24.9 (ROSSINI et al., 2020), rLIC13259 (CAVENAGUE et al., 2019). rLIC11711 e rLIC12587 (KOCHI et al., 2019), rLIC10774 (PASSALIA et al., 2020) e rLIC13086

(PASSALIA et al., 2021).

Dessa maneira, as proteínas foram avaliadas quanto a sua capacidade de interagir com esses componentes da matriz extracelular. Como controle da ausência de interação foram utilizados fetuína, gelatina e BSA. A **Figura *47*** demonstra que ambas rLIC11112 e rLIC20143 foram capazes de interagir somente com a laminina e nenhuma proteína apresentou interação com os controles negativos gelatina, fetuína e BSA.

Figura 47 - Estudo de adesão das proteínas recombinantes rLIC11112 e rLIC20143 aos componentes da matriz extracelular.



Laminina, colágeno tipo I e IV, fibronectina celular e plasmática, elastina, E-caderina e os controles negativos fetuína, gelatina e BSA (1 µg) foram imobilizados em placas de ELISA. Então, 1 µg da proteína recombinante foi adicionada por poço e as placas foram incubadas por 2 h a 37 ºC. A detecção da ligação foi feita pela incubação com anticorpo monoclonal anti-His conjugado com peroxidase (1:40.000) para rLIC11112 e (1:50.000) para rLIC20143. Os dados representam o valor da média ± desvio padrão de uma triplicata, e são representativos de dois experimentos independentes. A significância estatística foi calculada utilizando o BSA (controle negativo) para comparação pelo teste t-Student (*p<0,05). Gráficos gerados pelo GraphPrism.

Devido à dificuldade em se obter a proteína rLIC11111 purificada, a mesma não foi ensaiada quanto à ligação aos componentes do hospedeiro. Para tal, novas estratégias foram adotadas, como a criação de *L. biflexa* recombinante expressando as proteínas de interesse (descrito no item 3.18).

4.11.2. Componentes do plasma

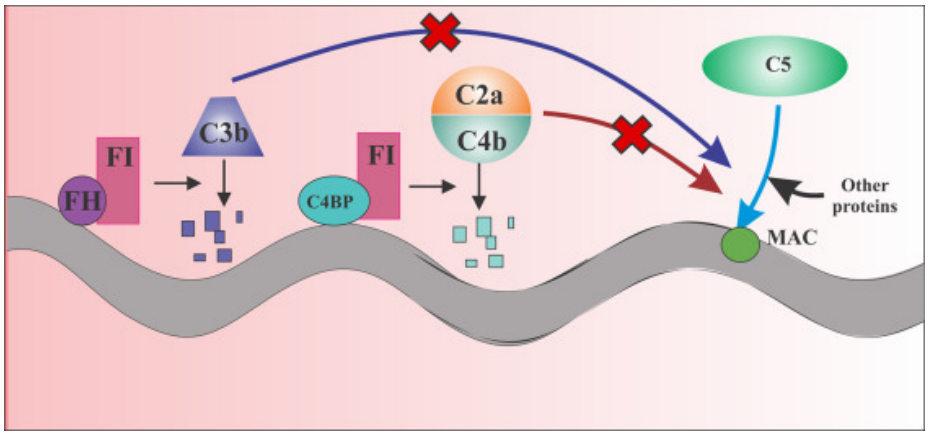
Apesar da resistência ao soro que as estirpes patogênicas de *Leptospira* spp. apresentam ter sido descrita há muitas décadas, os mecanismos subjacentes a esta resistência começaram a ser elucidados recentemente. Alguns patógenos desenvolveram estratégicas sofisticadas para superar o sistema de defesa imune de vários hospedeiros, sobretudo mecanismos para escapar da ativação e/ou ataque lítico do complemento (BARBOSA et al., 2010; MERI et al., 2005; VERMA et al., 2006). Entre estes mecanismos, pode ser citada a aquisição de reguladores solúveis do complemento, como Fator H e C4BP (C4 *binding protein*).

Verma et al., (2006) demonstram que as leptospiras patogênicas se ligam ao regulador do complemento fator H, e identificaram a proteína LfhA, também chamada de LenA, como um dos receptores. A proteína LenB também foi demonstrada como sendo um receptor de fator H (STEVENSON et al., 2007).

A vitronectina é uma glicoproteína multifuncional que possui um papel importante nos processos biológicos, como reparo tecidual, migração celular e regulação da via terminal do complemento por inibir a formação do complexo C5b7 e da polimerização do C9 (DA SILVA et al., 2015). A proteína LcpA foi identificada como sendo ligante a vitronectina pelo grupo de Da Silva *et al*. (2015); e nosso grupo identificou a rLIC13259 (CAVENAGUE et al., 2019), rLIC11711 e rLIC12587 (KOCHI et al., 2019) como ligantes.

Barbosa et al., (2009) demonstraram que as leptospiras são capazes de interagir com o regulador da via clássica do complemento – C4BP (**Figura *48***). *Leptospira* utiliza proteínas de superfície para se ligar esses reguladores e escapar do sistema imune. FH e C4BP aderidos à superfície bacteriana atuam como cofatores do fator enzimático I (FI) que cliva C3b e C4b, respectivamente, dessa maneira, evita a montagem do complexo de ataque à membrana (MAC). Desde então, foram identificados alguns ligantes deste componente na superfície da bactéria, como a LcpA (BARBOSA et al., 2010) e as proteínas Lig (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). Nosso grupo também identificou as proteínas Lsa33 (DOMINGOS et al., 2012) Lsa30 (SOUZA et al., 2012), Lsa23 (SIQUEIRA et al., 2013) e rLIC10508 (SIQUEIRA et al., 2016) como receptores de C4BP.

Figura 48 - Ação do sistema complemento dificultados pela interação do C4BP com a *Leptospira*



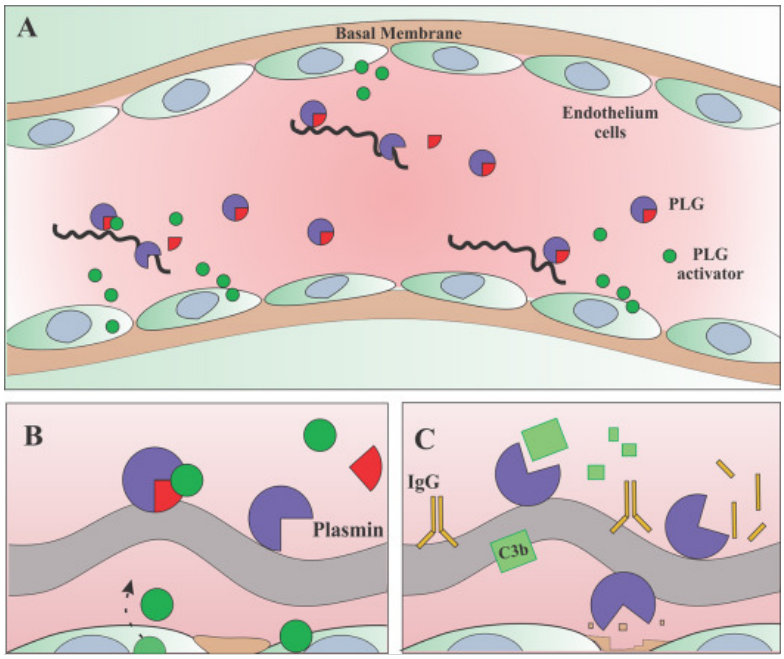
O complemento é fortemente regulado por um grande número de reguladores. As leptospiras patogênicas têm a capacidade de escapar do sistema imune por mecanismos de escape que envolvem o sequestro de reguladores solúveis do complemento do hospedeiro: C4BP e fator H (FH). *Leptospira* utiliza proteínas de superfície para se ligar a esses reguladores. FH e C4BP aderidos à superfície bacteriana atuam como cofatores do fator enzimático I (FI) que cliva C3b e C4b, respetivamente, evitando a montagem do complexo de ataque à membrana (MAC). Fonte: Fernandes *et al.* (2016).

A atividade proteolítica adquirida pela subversão de proteases por patógenos, como a plasmina, demonstrou ser um importante mecanismo de patogênese em várias infecções. A plasmina é uma serino-protease do sistema fibrinolítico que tem o zimógeno plasminogênio como seu principal componente (COLEMAN; BENACH, 1999).

Nosso grupo demonstrou a capacidade de *L. interrogans* de se ligar ao plasminogênio (VIEIRA et al., 2009) e que esta interação ocorre por meio de múltiplos ligantes (VIEIRA et al., 2010a). Essas proteínas possuem a capacidade de capturar plasminogênio circulante e induzir a secreção do ativador de plasminogênio pelas células do endotélio. O plasminogênio ligado às proteínas de superfície da *Leptospira* é ativado através da sua clivagem e consequentemente convertido em plasmina, que é capaz de degradar, entre vários substratos, laminina e fibronectina, componentes da matriz extracelular ou membrana basal e mediadores imunes, como C3b e imunoglobulina (**Figura *49***). Outras proteínas que apresentam essa característica são: Lsa20 (MENDES et al., 2011), Lsa66 (OLIVEIRA et al., 2011, 2014), Lsa33, Lsa25 (DOMINGOS et al., 2012), OmpL1 (FERNANDES et al., 2012), Lsa23, Lsa26, Lsa36 (SIQUEIRA et al., 2013), Lsa44, Lsa45 (FERNANDES et al., 2014), Lsa14 e Lsa19 (FIGUEREDO et al., 2017), Lsa16 e Lsa25.6 (PEREIRA et al., 2017), LipL46 (SANTOS et al., 2018), rLIC13259 (CAVENAGUE et al., 2019), Lsa24.9 (ROSSINI et al., 2020),

rLIC11711 e rLIC12587 (KOCHI et al., 2019).

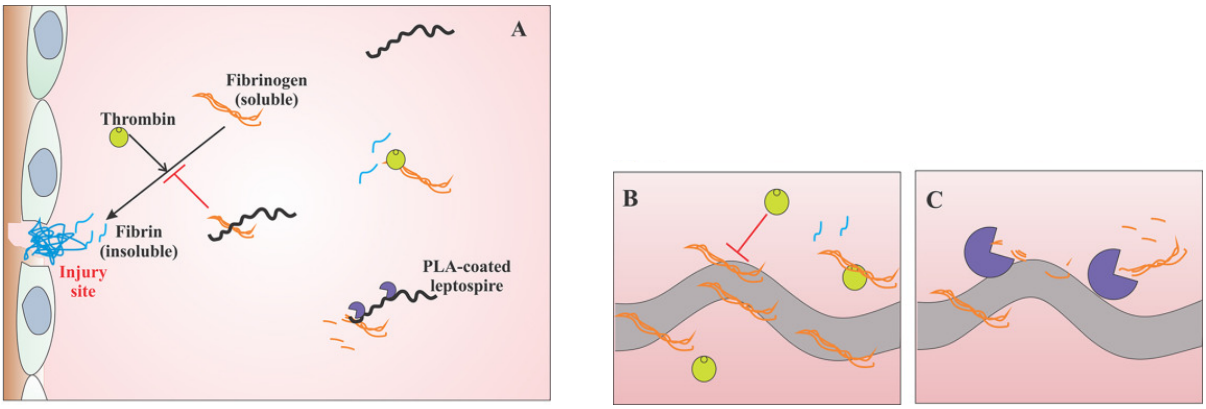
Figura 49 - Atividade proteolítica adquirida pela *Leptospira* via sistema plasminogênio/plasmina



(A)*Leptospira* é capaz capturar plasminogênio circulante através de seus vários receptores expostos à superfície e induzir a secreção do ativador de plasminogênio pelas células do endotélio. (B) Plasminogênio é o zimogênio da serino-protease de amplo espectro (PLA). (C) O plasminogênio ligado na superfície da *Leptospira* é ativado através da sua clivagem e consequentemente convertido em PLA, que é capaz de degradar, entre vários substratos, laminina e fibronectina, componentes da matriz extracelular ou membrana basal e mediadores imunes, como C3b e imunoglobulina.
Fonte: (Fernandes *et al.*, 2016).

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática composta por cadeias α, β e γ ligadas por 29 pontos dissulfeto (DOOLITTLE, 2010; RIVERA et al., 2007; WEISEL, 2005). As leptospiras têm a capacidade de se ligar ao fibrinogênio e alguns receptores já foram identificados (CHOY et al., 2007; PINNE; CHOY; HAAKE, 2010). Ademais, leptospiras virulentas são capazes de sequestrar a enzima trombina, provocando uma obstrução bilateral na reação de formação do coágulo de fibrina (FERNANDES et al., 2015) (**Figura *50***).

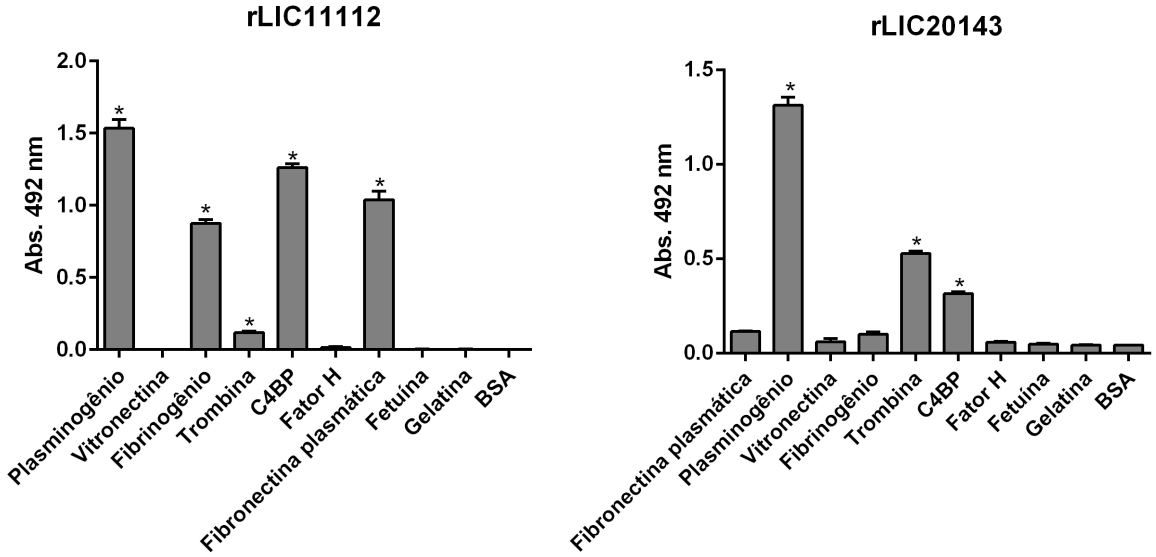
Figura 50 - Esquema geral da formação do coágulo de fibrina e como a *Leptospira* pode interferir



Leptospira spp. ligam-se ao fibrinogênio e reduzem a formação de coágulos de fibrina. (A) Após lesão tecidual, a cascata de coagulação é ativada por uma clivagem proteolítica do fator solúvel, culminando na geração de trombina, uma enzima capaz de converter o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel, um dos principais componentes do coágulo. A maioria do fibrinogênio ligado à superfície da *Leptospira* não pode ser convertida em fibrina na reação catalisada pela trombina, reduzindo assim a formação de fibrina (B). Além disso, as leptospiras revestidas com PLA são capazes de degradar o fibrinogênio e, portanto, reduzir sua disponibilidade, refletindo indiretamente a formação de coágulos de fibrina (C).
Fonte: (Fernandes *et al.*, 2016).

Dessa maneira, a ligação das proteínas recombinantes a componentes do plasma também foi avaliada. A ligação da rLIC11112 foi observada para plasminogênio, fibrinogênio, C4BP, fibronectina plasmática e trombina (**Figura *51***), enquanto a rLIC20143 interagiu com plasminogênio, trombina e C4BP. Todos os controles negativos (BSA, gelatina e fetuína) apresentaram baixos valores de absorbância.

Figura 51 - Estudo de adesão das proteínas recombinantes rLIC11112 e rLIC20143 aos componentes do plasma



Plasminogênio, vitronectina, fibrinogênio, trombina, C4BP, fator H e os controles negativos fetuína, gelatina e BSA (1 µg) foram imobilizados em placas de ELISA. Então, 1 µg da proteína recombinante foi adicionada por poço e as placas foram incubadas por 2 h a 37 ºC. A detecção da ligação foi feita pela incubação com anticorpo monoclonal anti-His conjugado com peroxidase (1:40.000) para rLIC11112 e (1:50.000) para rLIC20143. Os dados representam o valor da média +- desvio padrão de uma triplicata, e são representativos de dois experimentos independentes. A significância estatística foi calculada utilizando o BSA (controle negativo) para comparação pelo teste t-Student (*p<0,05). Gráficos gerados pelo GraphPrism.

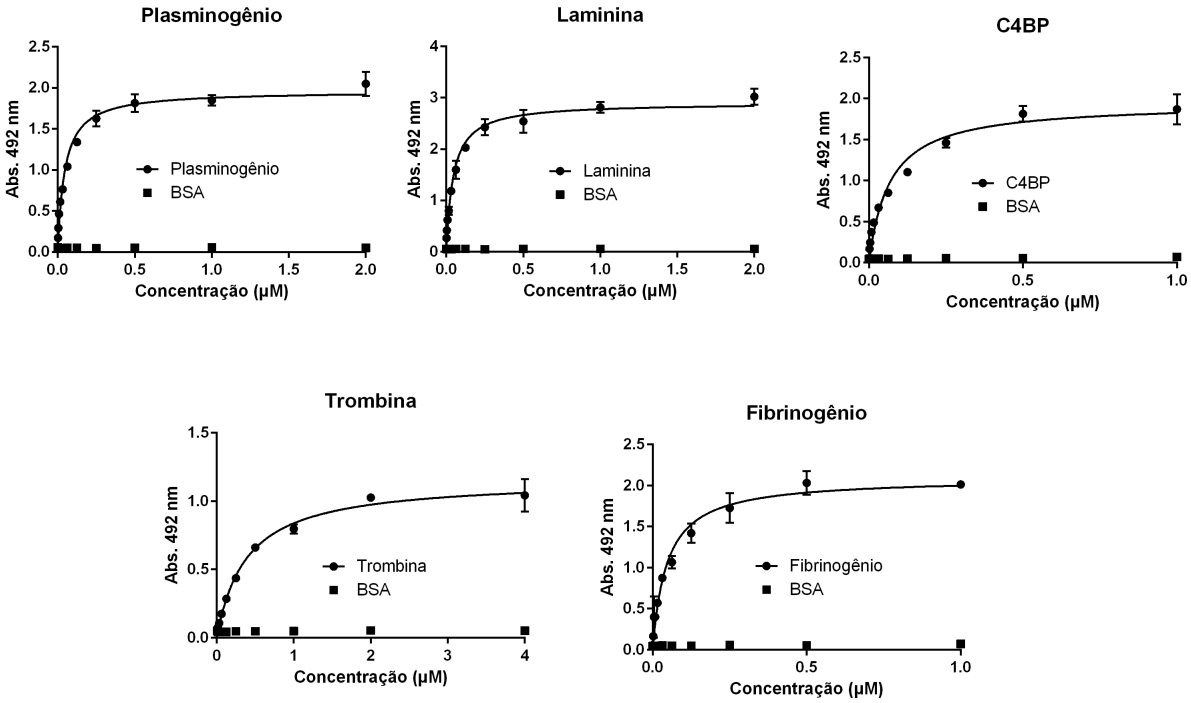
4.12. Curvas de dose-resposta dos componentes que apresentaram interação com a rLIC11112 e rLIC20143

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

É possível observar na **Figura *52*** que a rLIC11112 apresentou ligação dose-dependente e saturável a todos os componentes com os quais apresentou ligação significativa, ou seja, laminina, plasminogênio, fibrinogênio, fibronectina plasmática e C4BP. A

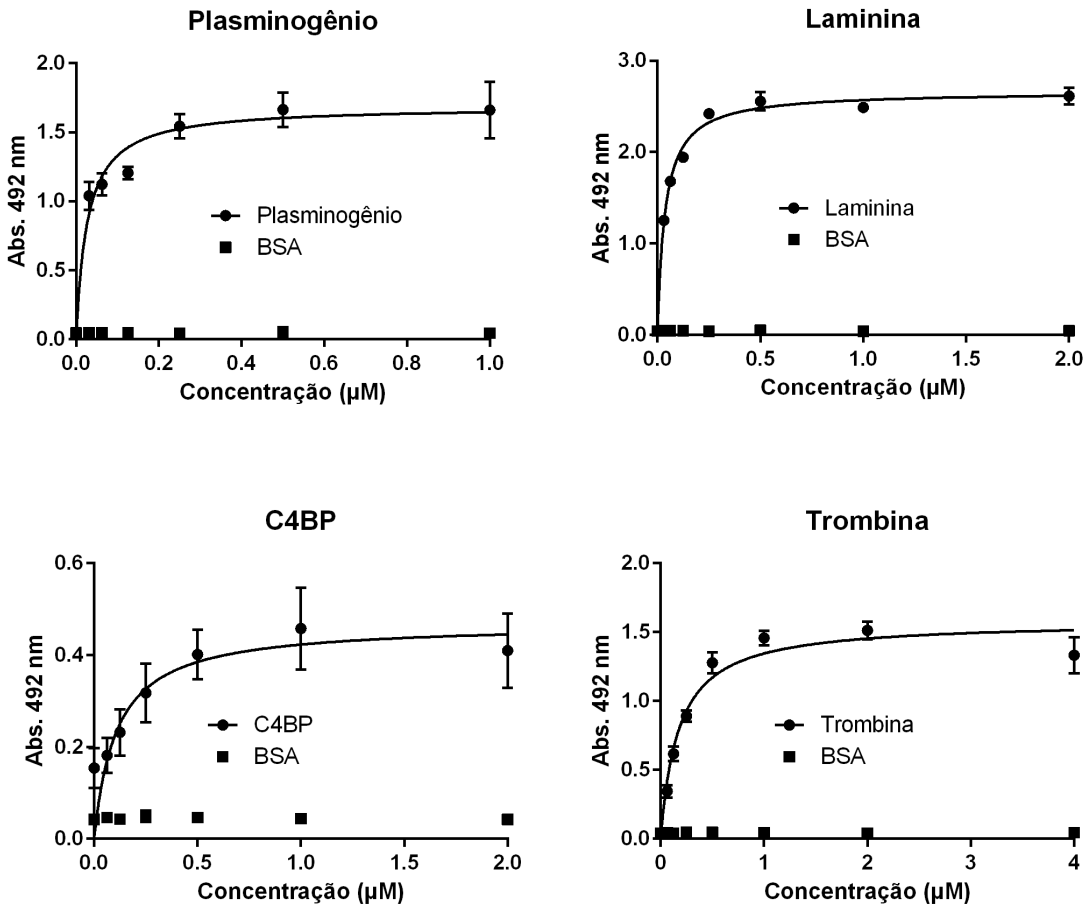
Figura *53* mostra os gráficos referentes aos componentes que tiveram ligação com a rLIC20143: plasminogênio, laminina, C4BP e trombina, onde é possível observar que todas foram dose-dependentes e saturáveis. Os valores de dissociação (K_D) estão apresentados na **Tabela 3**, sendo que os menores valores significam uma maior afinidade de ligação da proteína com o componente ensaiado.

Figura 52 - Curvas de dose-resposta da ligação da proteína recombinante a LIC11112 aos componentes da matriz extracelular e plasma



Experimentos de dose-resposta da proteína recombinante LIC11112 a plasminogênio, laminina, C4bp, trombina e fibrinogênio. Os componentes imobilizados foram incubados com concentrações crescentes da proteína recombinante; cada ponto foi feito em triplicata e expresso como a média ± o desvio padrão. O BSA foi incluído como controle negativo. A detecção da ligação foi feita por meio da incubação com anticorpo monoclonal anti-His conjugado com peroxidase (1:40.000). Gráficos gerados pelo GraphPrism.

Figura 53 - Curvas de dose-resposta da ligação da proteína recombinante a LIC20143 aos componentes da matriz extracelular e plasma



Experimentos de dose-resposta da proteína recombinante LIC20143 a plasminogênio, laminina, C4bp e trombina. Os componentes imobilizados foram incubados com concentrações crescentes da proteína recombinante; cada ponto foi feito em triplicata e expresso como a média ± o desvio padrão. O BSA foi incluído como controle negativo. A detecção da ligação foi feita por meio da incubação com anticorpo monoclonal anti-His conjugado com peroxidase (1:50.000). Gráficos gerados pelo GraphPrism.

Tabela 3 - Constantes de dissociação apresentadas pela proteína recombinante rLIC11112 e rLIC20143

	Plasminogênio	Laminina	C4BP	Trombina	Fibrinogênio
rLIC11112	46 ± 5	45 ± 3	67 ± 8	388 ± 30	46 ± 5
rLIC20143	27 ± 4	36 ± 2	109 ± 40	175 ± 23	-

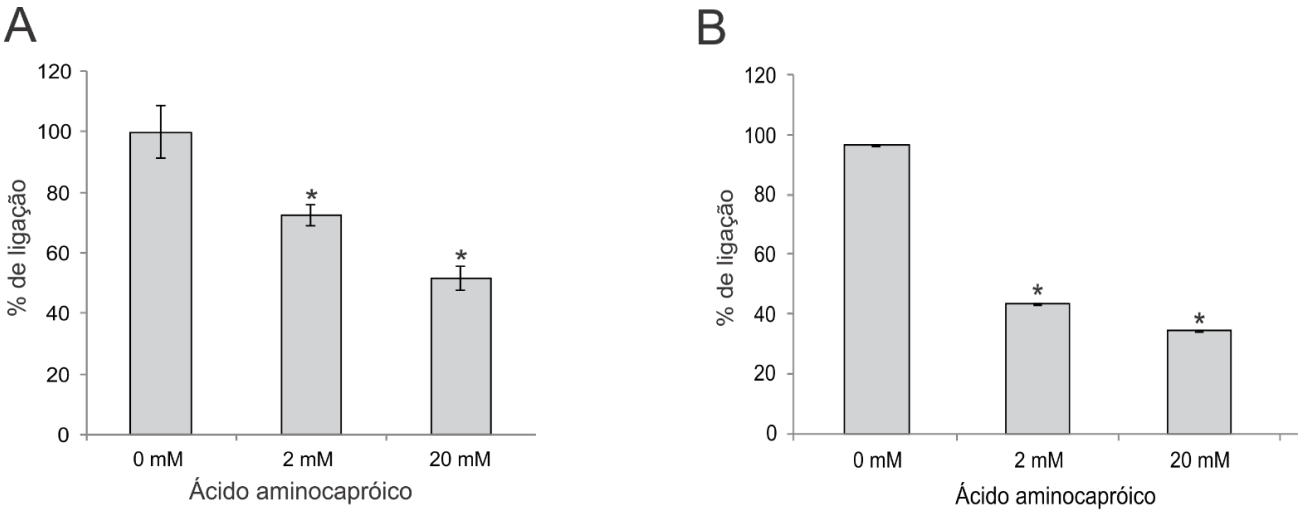
Nota: os valores apresentados nesta tabela estão expressos em nM.

4.13. Caracterização da interação de rLIC11112 e rLIC20143 com plasminogênio

A interação do plasminogênio com seus receptores proteicos bacterianos frequentemente ocorre via seus domínios *kringle* e resíduos de lisina da proteína (LÄHTEENMÄKI; KUKKONEN; KORHONEN, 2001). Nosso grupo demonstrou a participação desses domínios na interação do plasminogênio com *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Fiocruz L1-130) pela primeira vez (VIEIRA et al., 2009).

Por essa razão, a participação dos resíduos de lisina da proteína recombinante LIC11112 e LIC20143 na sua interação com o plasminogênio foi avaliada utilizando ACA, um análogo de lisina, durante a incubação do componente com as proteínas. Como pode-se observar na **Figura *54***A, apenas 2 mM de ACA inibiu a interação em aproximadamente 30%, enquanto 20 mM foi capaz de inibir 50% da interação para rLIC11112, enquanto para rLIC20143 (**Figura *54***B) tanto 2 mM quanto 20 mM foram suficientes para inibir em torno de 60%, o que sugere uma participação importante dos resíduos proteicos de lisina na interação plasminogênio - proteína.

Figura 54 - Avaliação do papel dos resíduos de lisina da proteína recombinante LIC11112 e LIC20143 na interação com o plasminogênio



Plasminogênio (10 µg/mL) foi imobilizado em placa de microdiluição e em seguida incubado com 1 µg da proteína recombinante (a) rLIC11112 e (b) rLIC20143 na presença (2 mM e 20 mM) ou ausência (0 mM) do análogo de lisina (ACA). A detecção da ligação ao plasminogênio foi realizada utilizando anticorpo monoclonal anti-His. As barras representam a % de ligação da proteína recombinante com o plasminogênio. A verificação da significância foi feita por meio do teste t-Student, em comparação com o tratamento sem inibição (*p<0,05).

Pode-se concluir que os resíduos de lisina (**Tabela 4**) nas proteínas recombinantes rLIC11112 e rLIC20143 tem uma participação para a ligação ao plasminogênio,

resultado já demonstrado na literatura pelo nosso grupo (DOMINGOS et al., 2015; FERNANDES et al., 2012; FIGUEREDO et al., 2017; KOCHI et al., 2019; SANTOS et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2015; VIEIRA et al., 2009).

Tabela 4 - Resíduos de lisina presentes nas proteínas codificadas pelos genes LIC11112 e LIC20143

Gene I.D.	Quantidade de resíduos de Lisina (%)	Total a.a.
LIC11112	31 (6,4)	484
LIC20143	38 (7,5)	504

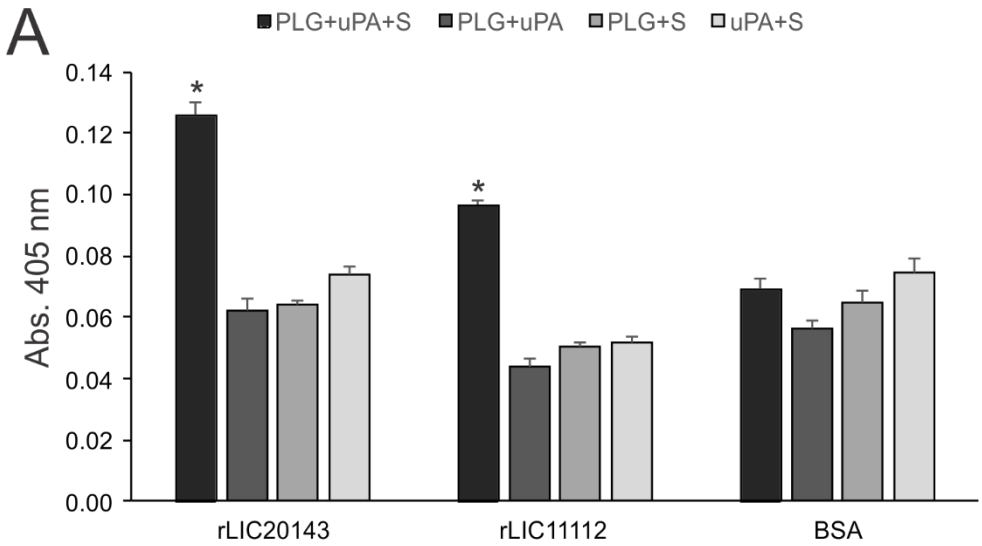
4.14. Ativação do plasminogênio ligado as proteínas recombinantes em plasmina

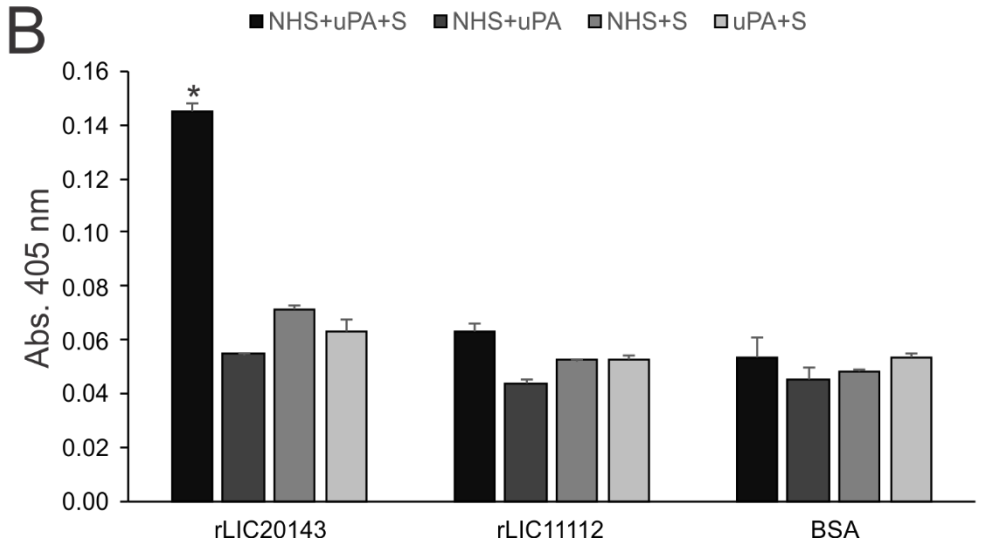
A plasmina é uma serino-protease de amplo espectro, gerada a partir da ativação do plasminogênio, capaz de degradar diversos componentes da matriz extracelular, imunoglobulinas e componentes do sistema complemento. Tem sido demonstrado que vários patógenos se aproveitam das proteases do hospedeiro como estratégia para permitir a penetração nos tecidos, sendo uma capacidade crucial para que a bactéria consiga se estabelecer no hospedeiro (COLEMAN; BENACH, 1999; LÄHTEENMÄKI; KUKKONEN; KORHONEN, 2001; VIEIRA; NASCIMENTO, 2016). A conversão do plasminogênio ligado à *L. interrogans* em plasmina, bem como sua atividade proteolítica, foi descrita pela primeira vez pelo nosso grupo de pesquisa (VIEIRA et al., 2009).

Para avaliar se o plasminogênio ligado às proteínas rLIC11112 e rLIC20143 tem capacidade de ser convertido em plasmina na presença de um ativador exógeno, como já demonstrado para outras proteínas recombinantes (CAVENAGUE et al., 2019; DOMINGOS et al., 2012; MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2016; VIEIRA et al., 2010a), cada proteína foi adsorvida em uma placa de microdiluição e incubada por 90 minutos com plasminogênio humano purificado ou contido em soro normal humano (SNH - Sigma); o componente livre foi lavado e o ativador uPA foi adicionado juntamente com substrato cromogênico específico para a plasmina. A reação foi mantida por 16 horas e a atividade da plasmina foi mensurada indiretamente pela clivagem do substrato a

405 nm. Como pode ser observado pela **Figura *55***, ambas as proteínas rLIC11112 e rLIC20143 tiveram a capacidade de capturar o plasminogênio (tanto do SNH quanto a proteína purificada) e este ser convertido em PLA, demonstrando a atividade proteolítica específica sobre o substrato. Controles negativos não apresentaram atividade enzimática. Esse resultado sugere que a proteína pode auxiliar a *Leptospira* a invadir o sistema do hospedeiro, contribuindo para sua disseminação.

Figura 55 - Conversão do plasminogênio purificado e presente no soro normal humano (SNH) ligado às proteínas recombinantes em plasmina





Proteínas recombinantes rLIC20143 e rLIC11112 imobilizadas em placa de microdiluição foram incubadas com plasminogênio ou soro normal humano (SNH), seguida de incubação

com uPA e substrato específico para plasmina (PLG+uPA+S). Controles falantando um dos tres componentes (PLG+uPA; PLG+S; uPA+S) e BSA foram utilizados. As barras represetam a médias das absorbancias obtidas a 405 nm, com uma dosagem relativa da degradação do substrato +- três desvios padrões para cada condição, e são representativas de dois experimentos independentes. Os cálculos estatísticos foram realizados pelo teste t bicaudal em relação ao BSA ($p<0,05$).
Abreviaturas: PLG: plasminogênio; SNH: Soro normal humano; uPA: ativados do plasminogênio tipo uroquinase; S: substrato ecromogênico específico para plasmina.

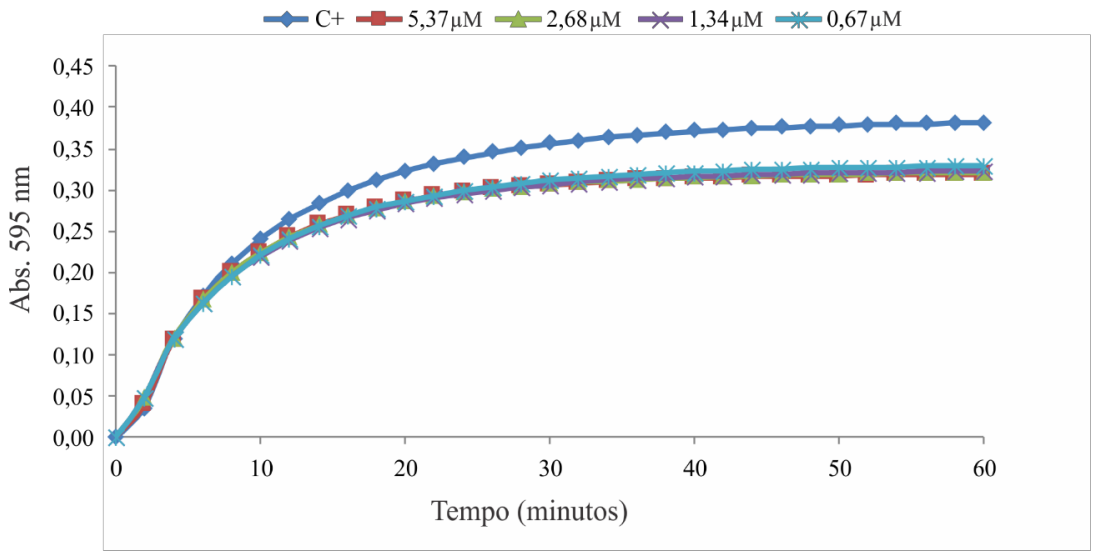
4.15. Inibição da formação do coágulo de fibrina

A ativação da protrombina em trombina pela cascata de coagulação converte o fibrinogênio solúvel em uma rede tridimensional de fibrina insolúvel, formando um coágulo (DOOLITTLE, 2010; WEISEL, 2005). Muitos patógenos conseguem interferir na cascata de coagulação e trombose se ligando ao fibrinogênio (CHAVAKIS et al., 2005; RIVERA et al., 2007).

Uma das manifestações mais graves da leptospirose inclui um sério quadro hemorrágico (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010), e um dos possíveis mecanismos para a explicação do aparecimento destes sintomas é que as leptospiras se ligariam ao fibrinogênio, dificultando ou impedindo a formação do coágulo de fibrina; de fato, as leptospiras se ligam ao fibrinogênio (CHOY et al., 2007; FERNANDES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2013; PINNE; CHOY; HAAKE, 2010) e algumas proteínas de superfície exercem uma diminuição na formação do coágulo de fibrina (GHOSH et al., 2019; LIN et al., 2011; PASSALIA et al., 2021), o que também pode favorecer a disseminação do patógeno.

Foi avaliado se a proteína rLIC11112 quando ligada ao fibrinogênio dificultaria sua ativação a fibrina. Conforme apresentado na **Figura *56***, a proteína apresentou um impedimento formação do coágulo com uma inibição de aproximadamente 16%.

Figura 56 - Inibição do coágulo de fibrina pela proteína rLIC11112.



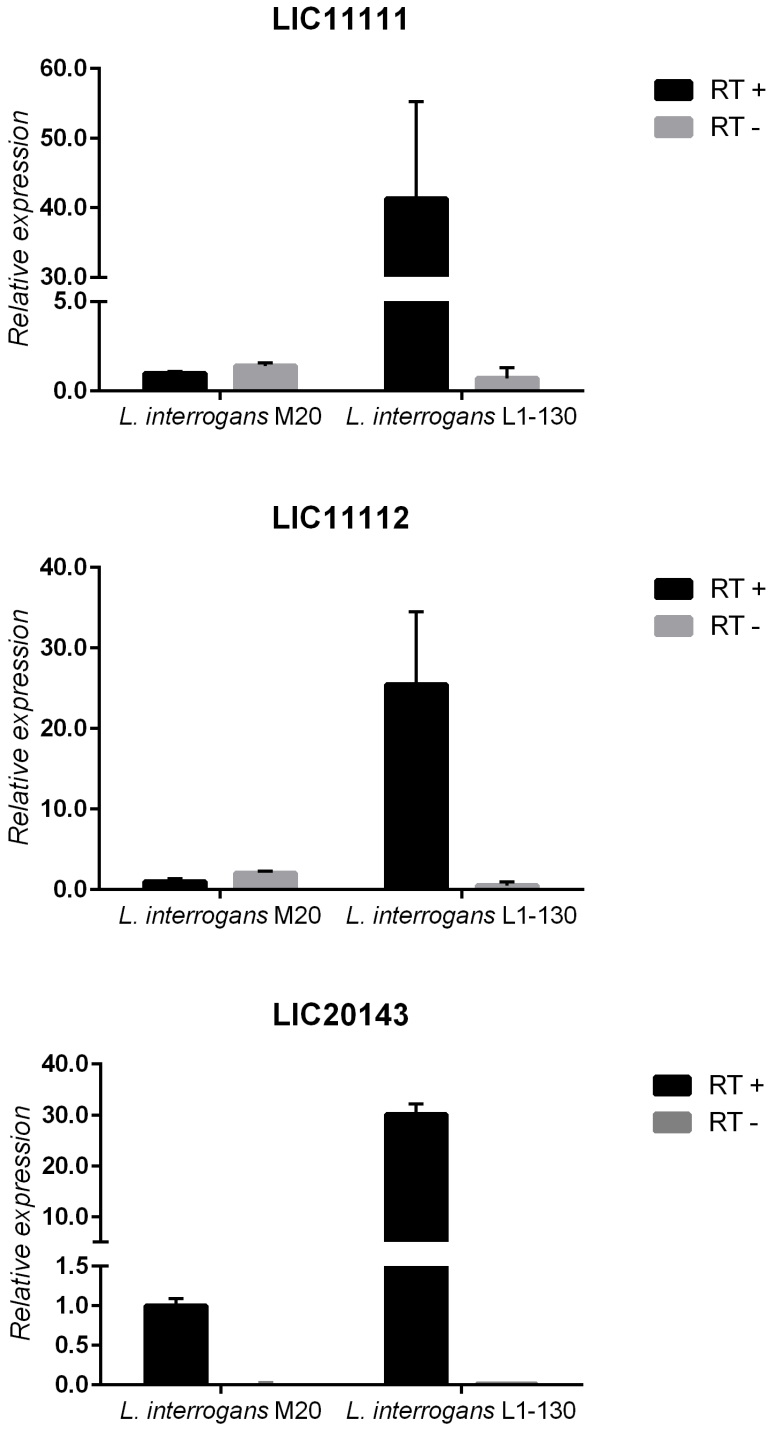
Fibrinogênio (1 mg/mL) foi incubado com a proteína rLIC11112 (3uM) por 2 h a 37 °C, e então foram adicionados 90 µL da solução a cada poço de uma placa de ELISA, mais 10 µL de trombina (10 U/mL). O experimento foi realizado em triplicata. O controle positivo (C+) se refere ao fibrinogênio mais trombina.

4.16. Avaliação da presença dos transcritos em *L. interrogans* sorovar Copenhageni nas estirpes atenuada e virulenta

Com o intuito de se comparar os níveis de expressão das estirpes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni atenuada (M20) e virulenta (L1-130), foi realizado um qPCR. De acordo com a **Figura *57*** é possível observar que os três genes (LIC11111, LIC11112 e LIC20143) tiverem expressão bem mais acentuada na estirpe virulenta (L1-130) quando comparada com a estirpe atenuada (M20), indicando uma associação ao estado de virulência da bactéria e sugerindo uma relevância biológica das proteínas na patogénese da bactéria.

O trabalho de Malmström et al., 2009 demonstrou, pela técnica de espectrometria de massa, a quantidade absoluta, ou seja, o número médio de cópias de proteínas por célula. As proteínas codificadas pelos genes LIC11111, LIC11112 e LIC20143 foram detectadas e apresentaram 61, 162 e 203 cópias por célula, respectivamente.

Figura 57 - Expressão dos genes LIC11111, LIC11112 e LIC20143 nas estirpes *L. interrogans* M20 e *L. interrogans* L1- 130



As reações de RT-qPCR foram realizadas empregando oligonucleotídeos, 400 ng de cDNA e o corante SYBR Green I. Controle da reação contendo todos os reagentes, exceto cDNA foi realizado em paralelo (NTC). O *fold change* foi calculado pelo método $\Delta\Delta C_T$ a partir dos valores de C_T obtidos após normalização com o controle endógeno 16S. As barras representam a média dos níveis de expressão relativa de cada gene nas estirpes virulentas de *Leptospira* em relação as estirpes atenuadas ± o desvio padrão.

4.17. Construções de plasmídeos para transformação de *L. biflexa* sorovar Patoc e avaliação do ganho de função

Conforme já descrito anteriormente neste trabalho, proteínas da membrana externa (OMPs) de *Leptospira* patogênica desempenham papéis importantes em diferentes etapas da patogênese, incluindo adesão a componentes da matriz extracelular (ECM) e ligação a reguladores do sistema imunológico e componentes dos sistemas fibrinolítico e de coagulação (CINCO, 2010; FERNANDES et al., 2016; VIEIRA et al., 2014, DAROZ et al., 2021 - submetido para publicação). Entretanto, a maioria desses estudos com proteínas é realizada *in vitro* por expressão heteróloga em *E. coli* e, embora muitas proteínas já estejam bem caracterizadas, ainda é necessário um conhecimento de seu papel na patogênese da leptospirose (KOCHI; FERNANDES; NASCIMENTO, 2020).

Recentemente, as ferramentas genéticas para entender o papel das proteínas de *Leptospira* têm crescido, permitindo a expressão heteróloga de proteínas de interesse por vetores replicativos tanto em *E. coli* quanto em *Leptospira* (GIRONS et al., 2000; PAPPAS; PICARDEAU, 2015) e posterior avaliação do ganho do fenótipo de função. Além disso, o *knock out* do gene por transposon aleatório (BOURHY et al., 2005; MURRAY et al., 2009) ou recombinação homóloga (BAUBY; SAINT GIRONS; PICARDEAU, 2003), e mais recentemente o silenciamento do gene usando CRISPRi (FERNANDES et al., 2019), tornaram possível estudar o fenótipo resultante da perda de função.

No entanto, a interrupção ou silenciamento de genes em estirpes patogênicas apresentam algumas desvantagens, devido à redundância funcional exibida por essas proteínas (ADLER, 2014), dificultando a observação de perdas fenotípicas significativas. Além disso, várias proteínas-alvo apresentam baixo número de cópias em *L. interrogans* (MALMSTRÖM et al., 2009), resultando em fenótipos imensuráveis, reduzindo a sensibilidade dessa estratégia.

Nesse sentido, a expressão de proteínas heterólogas por um promotor forte e constitutivo em *L. biflexa* está se tornando uma abordagem interessante para validar a atividade biológica de proteínas de *Leptospira* (FIGUEIRA et al., 2011; KOCHI; FERNANDES; NASCIMENTO, 2020; TOMA et al., 2014; ZHANG et al., 2012). A *L. biflexa* tem sido empregada como modelo para manipulação genética e análise de

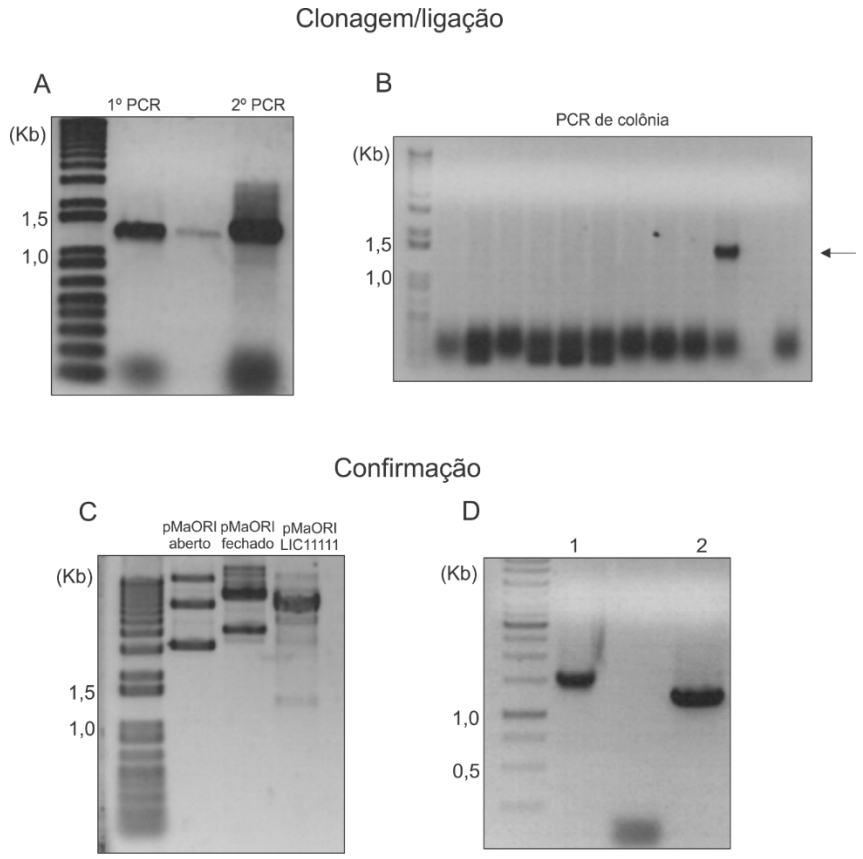
ganho de função. Embora falte a maioria dos fatores de virulência em comparação com as espécies patogênicas, ela compartilha os mesmos mecanismos de exportação de proteínas (PICARDEAU et al., 2008). As leptospiras saprofíticas também têm um crescimento mais rápido *in vitro*, com um tempo de geração de ~ 4h, atingindo a fase estacionária em 2-3 dias, enquanto o tempo de geração para estirpes patogênicas é de aproximadamente 20 h e o meio de cultura satura em torno de 4-7 dias (FAINE et al., 1999; LOUVEL; PICARDEAU, 2007).

A fim de avaliar o ganho de função de genes inseridos na *L. biflexa* originários da *L. interrogans*, uma estratégia de clonar o gene de interesse num vetor de expressão em leptospiras, chamado pMaORI, foi empregada. Para este trabalho foram selecionas 3 genes para fazer essas análises LIC11111, LIC11112 e LIC20143.

*4.17.1.*L. biflexa *sorovar Patoc recombinante LIC11111 fusionada a porção mínima (F6) do promotor do gene da* lipL32

O gene LIC11111 foi amplificado a fim de ser fusionado com uma parte da sequência do promotor do gene da *lipL32* (porção mínima – F6). Após a amplificação, os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. É possível observar na **Figura *58***A as bandas correspondentes tanto a primeira quanto a segunda amplificação. Após o ensaio de digestão, ligação no plasmídeo pMaORI e transformação da bactéria π1, as colônias crescidas na placa foram submetidas a uma reação de PCR utilizando oligonucleotídeos que flanqueiam a região de inserção do gene no plasmídeo (pMaORI F e pMaORI R – Quadro 6). A **Figura *58***B mostra uma banda na altura esperada, indicando que a ligação foi eficiente. Para confirmação de que a banda era de fato do gene LIC11111, foi feito um gel com os plasmídeos pMaORI circular, linear e ligado com o gene para mostrar os diferentes padrões de altura (**Figura *58***C). Além disso, foi feito um PCR com os oligonucleotídeos de clonagem e pMaORI F e R (Quadro 6) para confirmar a ligação (**Figura *58***D).

Figura 58 - Géis de confirmação da amplificação do gene da LIC11111 para fusão com a versão mínima do promotor (F6) da *lipL32* e da ligação do inserto no vetor pMaORI

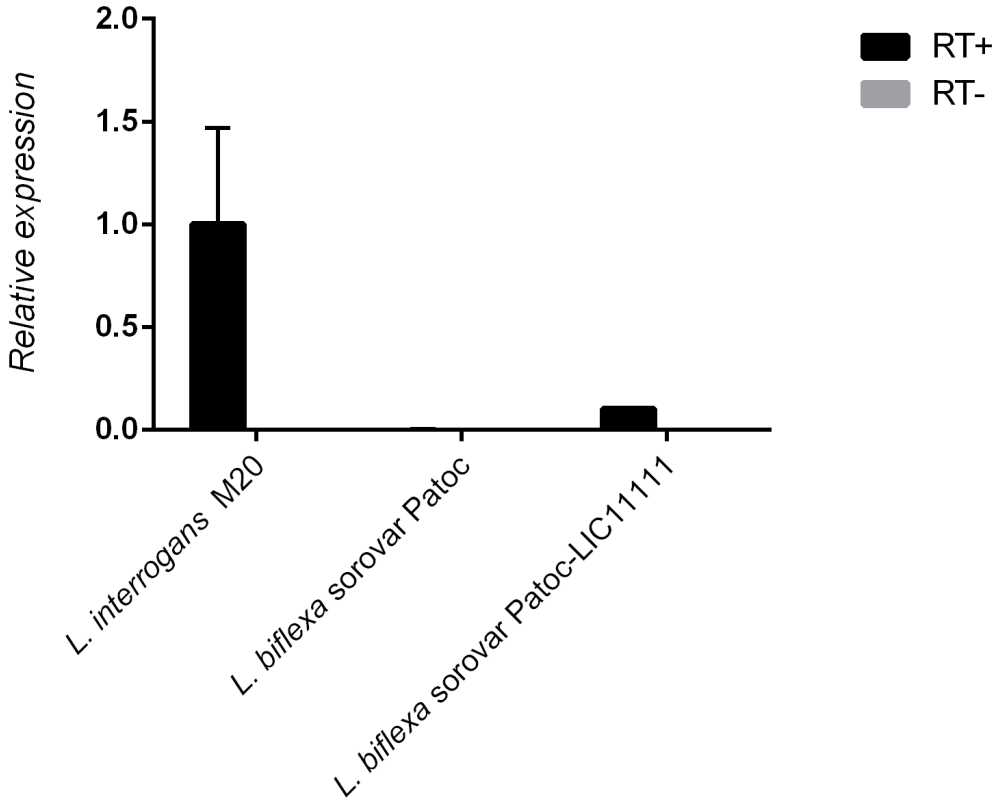


Géis de agarose mostrando as etapas da construção da sequência da LIC11111 fusionada com o promotor e terminador de transcrição. (a) 1º *amplicon* gerado contendo o gene de interesse e 2º *amplicon* incorporado com a porção mínima do promotor (F6) e o terminador. (b) PCR de colônia após a transformação da bactéria com o produto de ligação do inserto no vetor pMaORI mostrando uma colônia positiva. (c) Confirmação da ligação mostrando o pMaORI aberto, fechado e pMaORI-LIC11111 ensaio de digestão mostrando o inserto (1,5 Kb) liberado.

Após a transformação das leptospiras com o plasmídeo contendo o gene de interesse e recuperação de bactérias recombinantes, foi realizado um ensaio de RT-qPCR para validação da expressão em *L. biflexa* sorovar Patoc. A Error! Not a valid bookmark self-reference. mostra que a bactéria *L. biflex*a sorovar Patoc-LIC11111 não foi capaz de ter uma expressão expressiva da proteína quando comparada com a *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M20). Entretanto, quando comparada com a bactéria selvagem de *L. biflexa*, observa-se que uma expressão, o que significa que a bactéria incorporou o plasmídeo e conseguiu expressar, mesmo que pouco.

O fato de a sequência gênica ter sido fusionada com a porção mínima (F6) do promotor da *lipL32*, pode ter sido um dos motivos pelos quais não foi possível obter expressão significativa. O próximo passo foi refazer a construção utilizando a região completa do promotor, a fim de comparar se a expressão é aumentada.

Figura 59 - Expressão do gene LIC11111 *L. interrogans* M20, *L. biflexa* sorovar Patoc e *L. biflexa* sorovar Patoc transformada com o plasmídeo pMaORI-LIC11111



As reações de RT-qPCR foram realizadas empregando oligonucleotídeos, 400 ng de cDNA e o corante SYBR Green I. Controle da reação contendo todos os reagentes, exceto cDNA foi realizado em paralelo (NTC). O *fold change* foi calculado pelo método $\Delta\Delta C_T$ a partir dos valores de C_T obtidos após normalização com o controle endógeno 16S. As barras representam a média dos níveis de expressão relativa da *L. biflexa* sorovar Patoc-LIC11111 em relação a estirpe atenuada ± o desvio padrão.

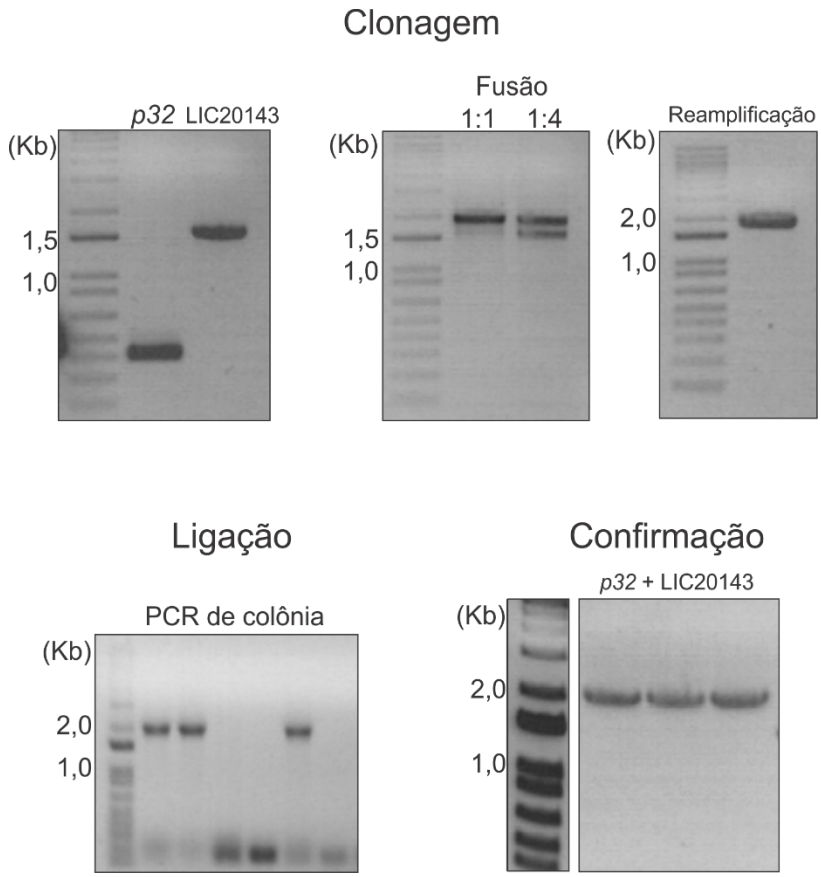
*4.17.2.*L. biflexa *sorovar Patoc recombinante LIC11112 e LIC20143 fusionada a porção completa do promotor do gene da lipL32*

Outra estratégia de clonagem foi implementada também para o gene LIC20143. A região codificadora da proteína e a sequência completa do promotor da

lipL32 (-334 nucleotídeos a montante do sítio de início de transcrição (ZHUKOVA et al., 2017), foram amplificados utilizando os oligonucleotídeos descritos no Quadro 4. Após cada etapa de PCR, os *amplicons* gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

A **Figura *60*** mostra a etapa de clonagem onde a sequência do promotor e o gene LIC20143 foram amplificados e apresentaram tamanho esperado. Após essa primeira rodada de PCR, as duas sequências amplificadas foram submetidas a etapa de fusão com duas concentrações distintas de promotor:gene, sendo 1:1 e 1:4. Na **Figura *60*** é possível observar que a melhor proporção foi de 1:1, sendo assim essa sequência foi reamplificada utilizando os oligonucleotídeos p32 F e LIC20 R para obter maior quantidade de *amplicon*.

Figura 60 - Géis de confirmação da amplificação do gene da LIC20143, do promotor da *lipL32* e da ligação do inserto fusionado no vetor pMaORI

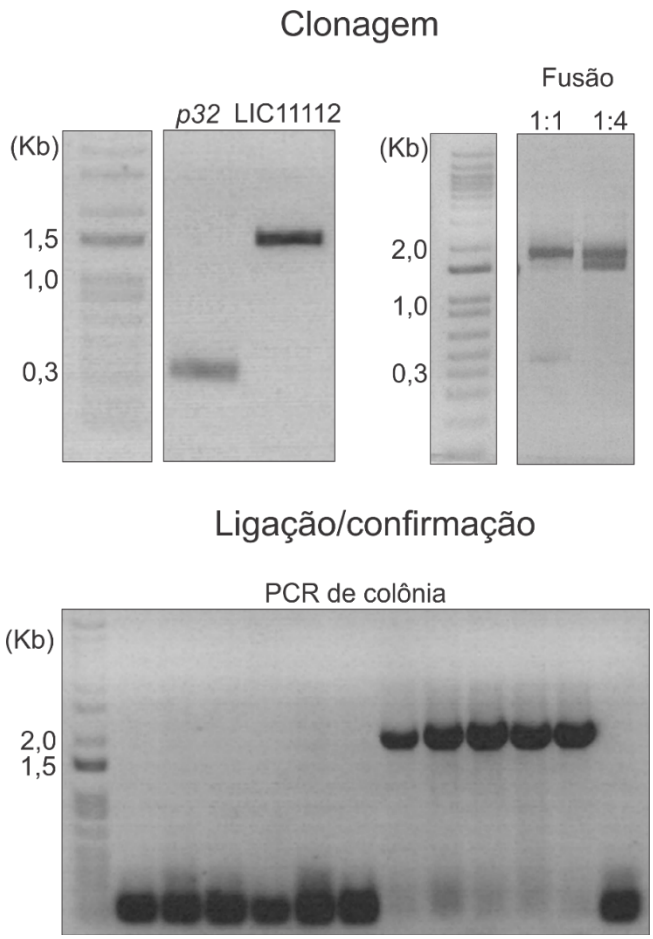


Géis de agarose mostrando as etapas da construção da sequência da LIC20143 fusionada com a sequência completa do promotor da *lipL32*. Etapa de clonagem mostrando a amplificação do promotor (p32) e da região codificadora (LIC20143). Etapa de fusão em duas proporções 1:1 e 1:4 (v/v) de promotor e sequência genica. Etapa de reamplificação, foi

utilizado a proporção 1:1 para reamplificar e obter a sequência completa. Etapa de ligação confirmada por PCR de colônia, onde as colônias crescidas foram submetidas ao PCR com os oligonucleotídeos pMaORI F e pMaORI R (Quadro 6). Etapa de confirmação mostrando que as 3 colônias obtidas no PCR de colônia eram de fato positivas.

Após a etapa de clonagem, os amplicons e o vetor pMaORI foram submetidos ao ensaio de digestão com as enzimas *Not*I e *Xba*I e posteriormente ligados utilizando protocolo descrito previamente. Para confirmação da ligação, as colônias crescidas em placa após a transformação (protocolo previamente descrito) foram submetidas ao PCR de colônia, onde foram recuperadas 3 colônias positivas para LIC20143 e 5 para LIC11112. As colônias consideradas positivas foram colocadas para crescer em meio líquido LB com o antibiótico espectinomicina e dT (timidina), os plasmídeos foram recuperados utilizando o *kit plasmid mini prep* e um novo PCR foi feito para confirmação que os plasmídeos continham a sequência desejada. No gel de confirmação é possível observar a obtenção dos plasmídeos positivos (**Figura *61***).

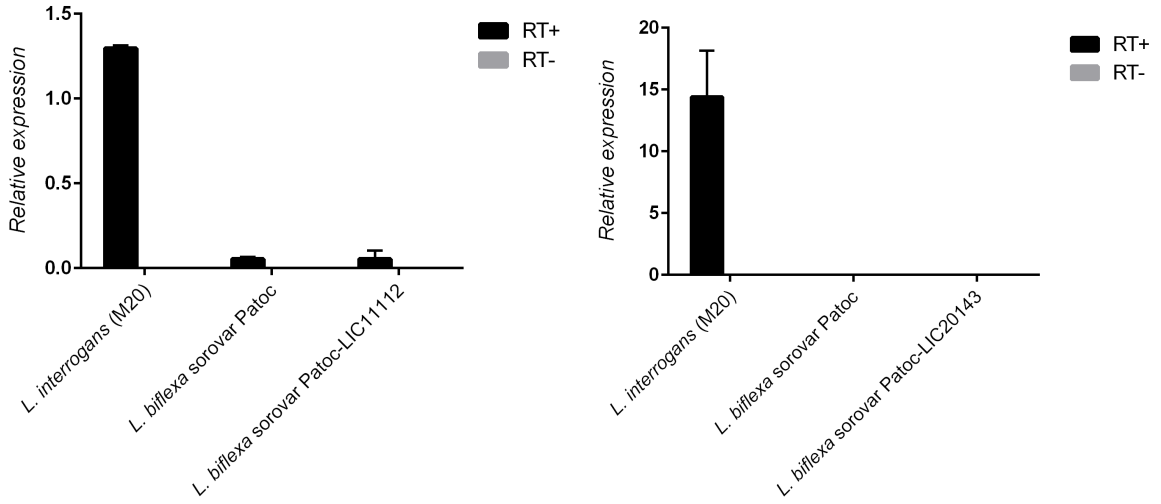
Figura 61 - Confirmação da ligação do gene LIC11112 fusionado ao promotor do gene da *lipL32* no vetor pMaORI



Géis de agarose mostrando as etapas da construção da sequência da LIC11112 fusionada com a sequência completa do promotor da *lipL32*. Etapa de clonagem mostrando a amplificação do promotor (p32) e da região codificadora (LIC11112). Etapa de fusão em duas proporções 1:1 e 1:4 (v/v) de promotor e sequência genica. Etapa de ligação confirmada por PCR de colônia, onde as colônias crescidas foram submetidas ao PCR com os oligonucleotídeos pMaORI F e pMaORI R (Quadro 6).

Após a confirmação da ligação no vetor, *L. biflexa* foi transformada com os plasmídeos contendo os genes de interesse LIC20143 e LIC11112 por eletroporação (previamente descrito) e então bactérias recombinantes foram submetidas a um ensaio de qPCR para determinar a quantidade de transcritos. A **Figura *62*** mostra que não foi possível observar aumento de expressão quando comparada com a *L. biflexa* selvagem (sem o plasmídeo de expressão).

Figura 62 - Expressão gênica da LIC11112 e LIC20143 fusionadas com o promotor completo da *lipL32* e transformadas em *L. biflexa* sorovar Patoc



As reações de RT-qPCR foram realizadas empregando oligonucleotídeos, 400 ng de cDNA e o corante SYBR Green I. Controle da reação contendo todos os reagentes, exceto cDNA foi realizado em paralelo (NTC). O *fold change* foi calculado pelo método $\Delta\Delta C_T$ a partir dos valores de C_T obtidos após normalização com o controle endógeno 16S. As barras representam a média dos níveis de expressão relativa da *L. biflexa* sorovar Patoc-LIC11111 em relação a estirpe atenuada ± o desvio padrão.

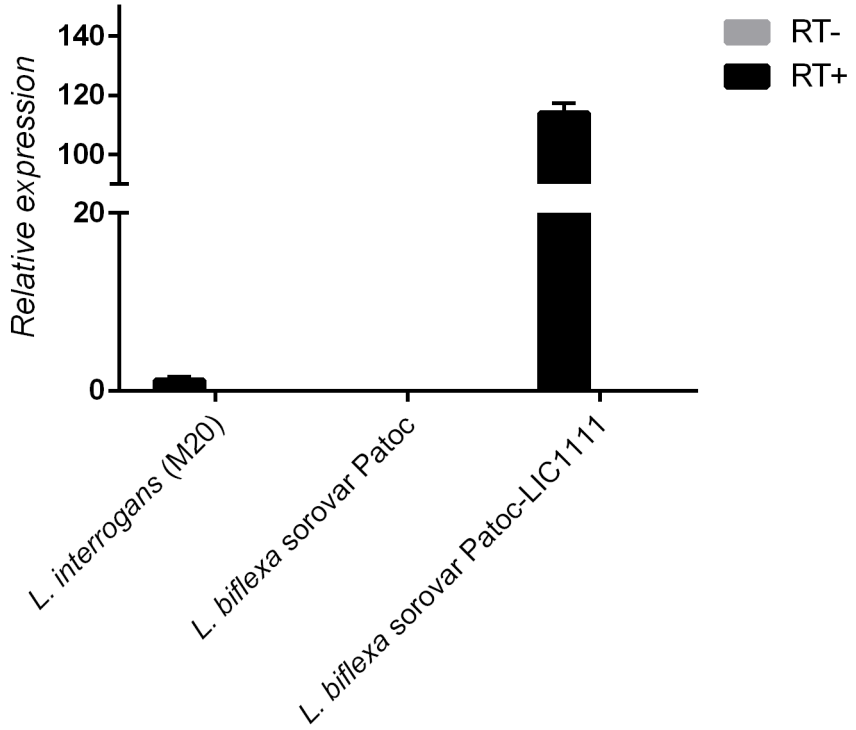
*4.17.3.*L. biflexa *sorovar Patoc recombinante LIC1111, LIC11112 e LIC20143 fusionadas ao promotor da* lipL21

Paralelamente aos ensaios descritos acima, foi feito um teste utilizando o promotor completo do gene da *lipL21*. Baseados nos resultados, a LIC11111 fusionado ao promotor do gene da *lipL21* foi capaz de ter uma expressão na bactéria (**Figura *63***). Por esse motivo, a estratégia adotada foi refazer a construção utilizando o promotor do gene da *lipL21* a fim de comparar se a expressão é aumentada. Por isso, foram encomendados genes sintéticos com a região dos genes LIC11111, LIC11112 e LIC20143 fusionadas com o promotor da *lipL21*.

Inicialmente, foram realizados ensaios somente com o gene da LIC11111 para determinar a viabilidade do uso desse promotor. A sequência do gene sintético (região codificadora da LIC11111 fusionado com o promotor) foi reamplificada, ligada no vetor pMaORI e transformada em *L. biflexa* conforme protocolo já descrito. A **Figura *63*** mostra os resultados de RT-PCR para a construção contendo o promotor do gene *lipL21* (pMaORI-LIC11111-p21), e ela apresentou um aumento de transcritos

de 110 vezes, aproximadamente, quando comparada tanto com a *L. interrogans* quanto com a *L. biflexa* selvagem.

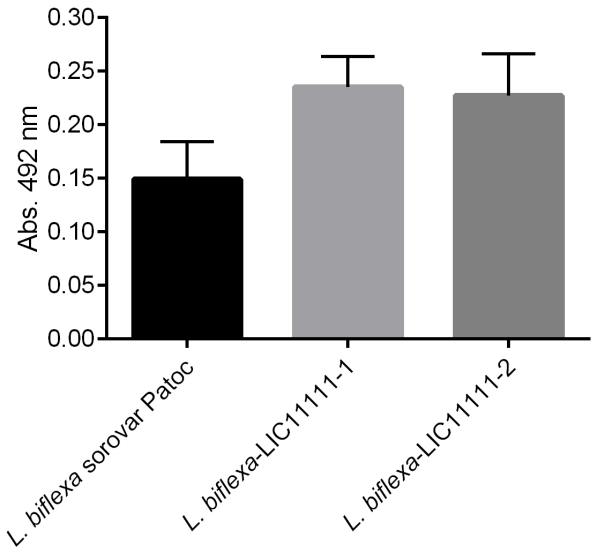
Figura 63 - Expressão do gene LIC11111 em *L. interrogans* M20*, L. biflexa* sorovar Patoc e *L. biflexa* sorovar Patoc transformada com o plasmídeo pMaORI contendo a LIC1111 fusionada ao promotor da *lipL21*.



As reações de RT-qPCR foram realizadas empregando oligonucleotídeos, 400 ng de cDNA e o corante SYBR Green I. Controle da reação contendo todos os reagentes, exceto cDNA foi realizado em paralelo (NTC). O *fold change* foi calculado pelo método $\Delta\Delta C_T$ a partir dos valores de C_T obtidos após normalização com o controle endógeno 16S. As barras representam a média dos níveis de expressão relativa da *L. biflexa* sorovar Patoc-LIC11111 em relação a estirpe atenuada ± o desvio padrão.

Além disso, foi feito um ELISA de localização com bactéria intacta para verificar se houve aumento de expressão na bactéria recombinante pMaORI-LIC11111-p21, quando comparada com a bactéria selvagem. Segundo a **Figura *64***, foi observado um leve aumento no sinal de detecção da bactéria transformada com o vetor pMaORI contendo o gene da LIC1111, quando comparada com a *L. biflexa* selvagem.

Figura 64 - Ensaio de localização da bactéria recombinante LIC11111 intacta

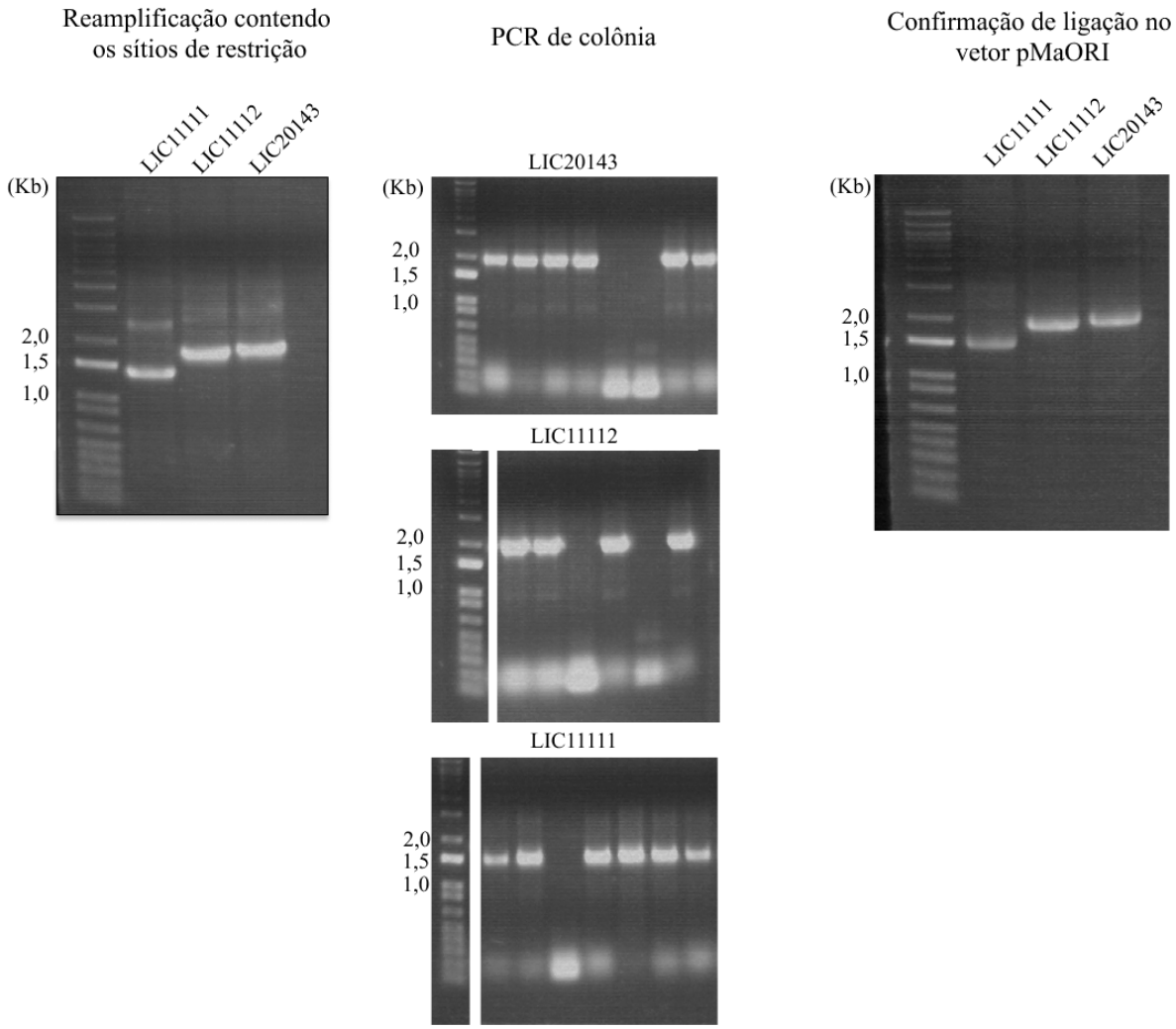


L. biflexa sorovar Patoc (selvagem), *L. biflexa*-LIC11111-1 e *L. biflexa*-LIC11111-2 (duplicatas) foram imobilizados em placas de ELISA, com DO ajustada para 0,4, contendo aproximadamente $2x10^8$ bactériase mantidas a 30 °C por 16 horas. Depois, adicionou-se soro anti LIC11111 (1:1.000) nos pocos e as placas foram incubadas por 2 h a 30 ºC. A detecção da ligação foi feita pela incubação com anticorpo monoclonal anti-mouse conjugado com peroxidase (1:5.000). Os dados representam o valor da média ± desvio padrão de uma duplicata, e são representativos de dois experimentos independentes. A significância estatística foi calculada utilizando o BSA (controle negativo) para comparação pelo teste t-Student (*p<0,05).

Tendo obtido resultados promissores com a LIC1111, foram encomendados os genes sintéticos da LIC11112 e LIC40143 fusionados ao promotor completo da *lipL21*. Então, foi realizada a amplificação a partir de genes sintéticos encomendados para incorporação dos sítios de restrição. Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Após o ensaio de digestão, ligação no plasmídeo pMaORI e transformação da bactéria π1, as colônias crescidas na placa foram submetidas a uma reação de PCR utilizando oligonucleotídeos que flanqueiam a região de inserção do gene no plasmídeo (pMaORI F e pMaORI R – Quadro 6). A

Figura ***65*** mostra bandas nas alturas esperadas para os três genes na coluna “PCR de colônia”, indicando que a ligação foi eficiente. As colônias positivas foram colocadas para crescer em meio líquido e para confirmação de que as colônias eram de fatos dos genes estudados, foi realizado um novo PCR com os oligonucleotídeos pMaORI F e pMaORI R (Quadro 6) para confirmação da ligação.

Figura 65 - Géis de confirmação da reamplificação dos genes LIC11111, LIC11112 e LIC20143 sintéticos fusionados com o promotor da *lipL21* e ligação do inserto no vetor pMaORI



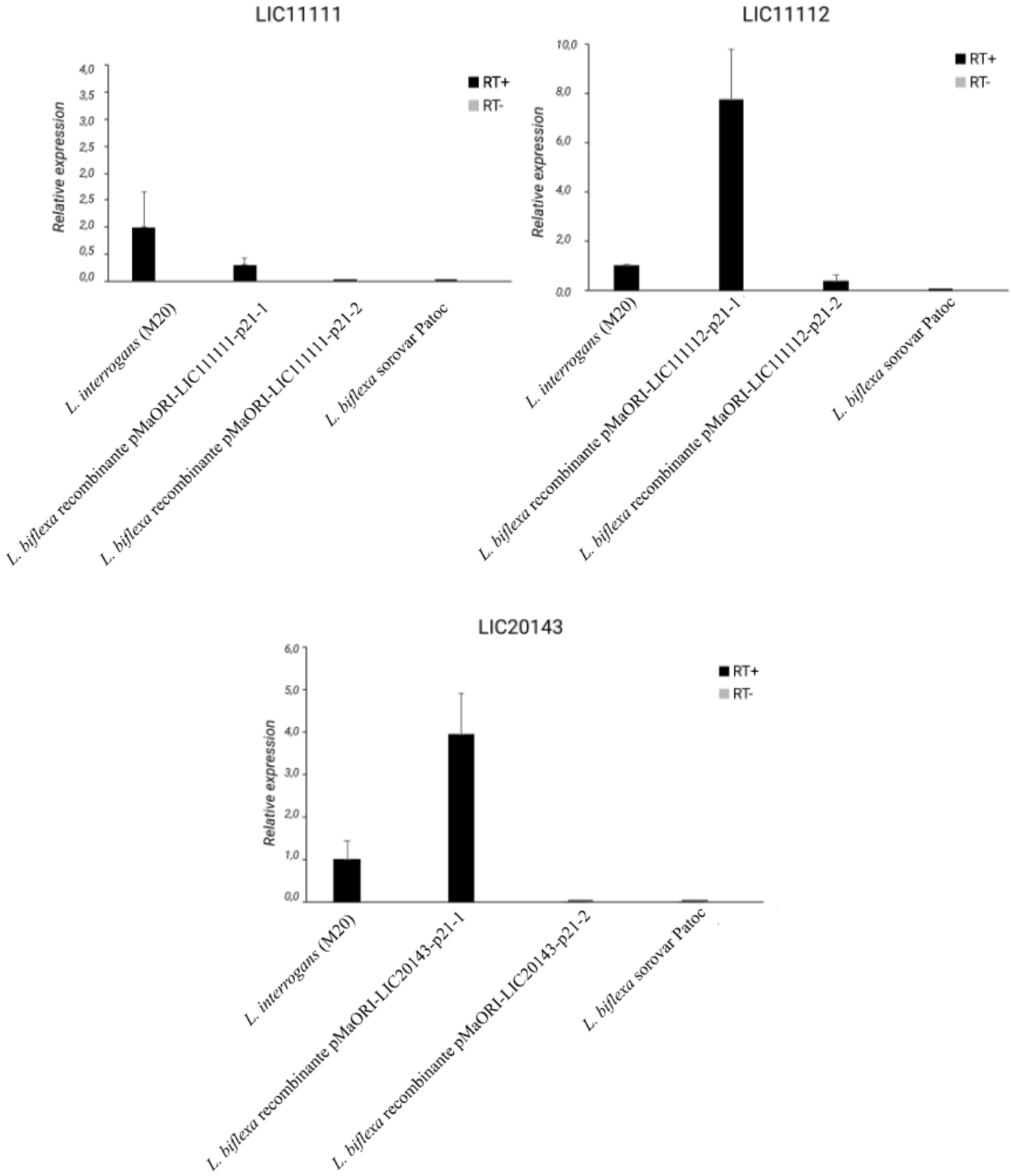
Géis de agarose mostrando as etapas da reamplificação das sequências da LIC11112, LIC11037 e LIC20143 fusionada com o promotor da *lipL21*. Foi feita a reamplifcação para incorporação dos sítios de restrição. Após digestão, ligação e transformação em bactérias π1, as colônias crescidas na placa foram submetidas a uma reação de PCR de colônia utilizando oligonucleotídeos que flanqueiam a região de inserção do gene no plasmídeo (pMaORI F e pMaORI R - Quadro 6). As colônias positivas foram crescidas em meio líquido e submetidas novamente a um PCR para confirmação da ligação.

Após a transformação das leptospiras com o plasmídeo contendo os genes de interesse, foi realizado um ensaio de RT-qPCR para validação da expressão em *L. biflexa* sorovar Patoc. A **Figura *66*** mostra que a bactéria *L. biflex*a recombinante-LIC11111-1 e *L. biflex*a recombinante-LIC11111-2 (duplicatas) não foram capazes de ter uma expressão alta da proteína quando comparada com a *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M20). Entretanto, quando comparada com a bactéria selvagem de *L.*

biflexa, observa-se uma pequena quantidade de transcritos, o que significa que a bactéria incorporou o plasmídeo e conseguiu transcrever, mesmo que em baixa concentração. Já as bactérias *L. biflex*a recombinante-LIC11112-1 e *L. biflex*a recombinante-LIC20143-1 tiveram uma quantidade alta de transcritos quando comparado com a *L. interrogans* (M20), em torno de 8 vezes e 4 vezes mais, respectivamente.

Na **Figura *63*** foi apresentado um RT-PCR onde uma quantidade alta de transcritos para a pMaORI-LIC11111-p21 foi detectada, entretanto na **Figura *66*** houve pouco transcrito para a mesma construção. Os experimentos foram realizados utilizando clones diferentes, uma vez que o clone do primeiro experimento foi perdido. Isso demonstra uma dificuldade em reproduzir os ensaios, já que clones diferentes não apresentaram um mesmo comportamento.

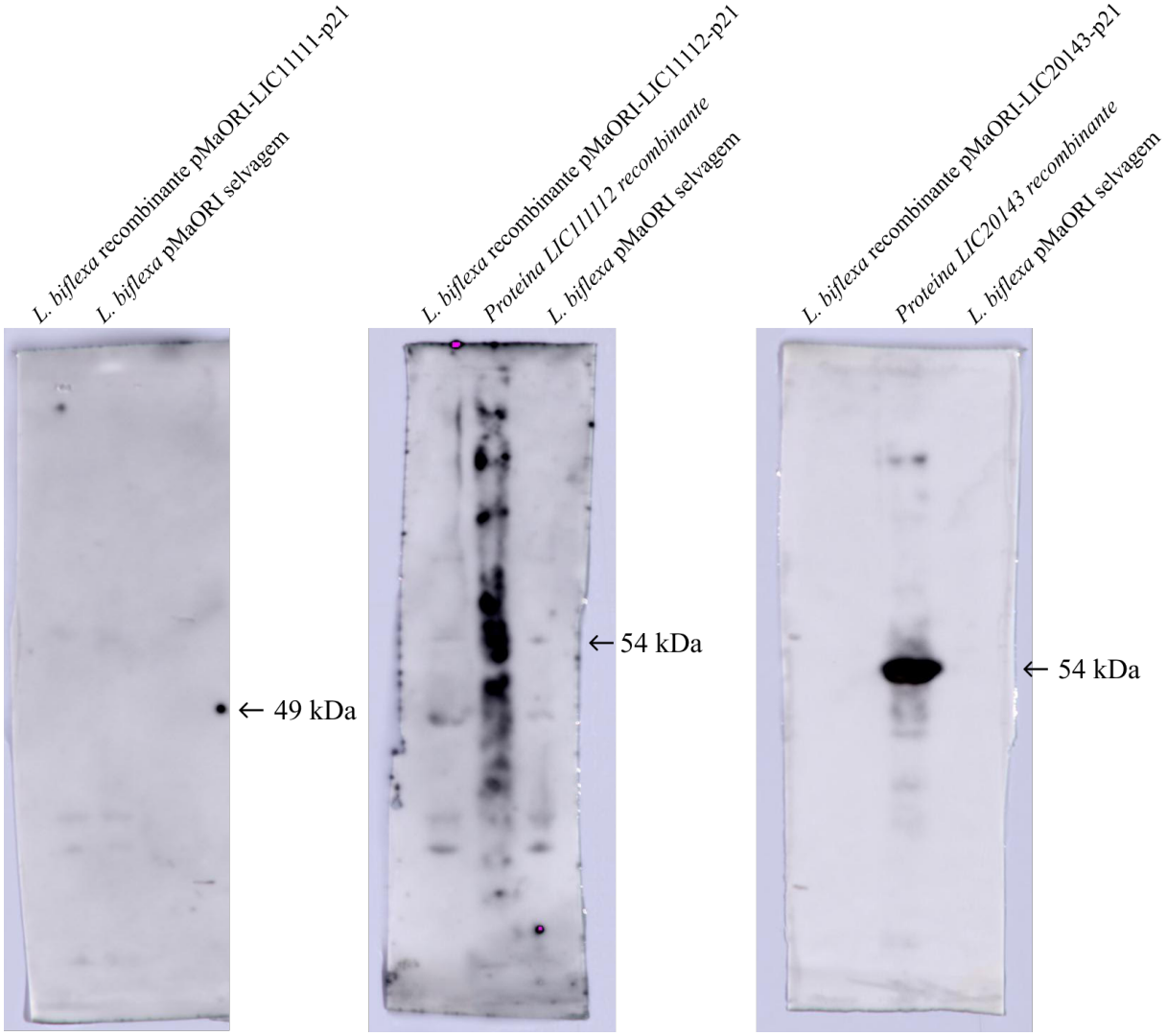
Figura 66 - Expressão do gene LIC11111 *L. interrogans* M20, *L. biflexa* sorovar Patoc e *L. biflexa* sorovar Patoc transformada com o plasmídeo pMaORI.



As reações de RT-qPCR foram realizadas empregando oligonucleotídeos, 400 ng de cDNA e o corante SYBR Green I. Controle da reação contendo todos os reagentes, exceto cDNA foi realizado em paralelo (NTC). O *fold change* foi calculado pelo método $\Delta\Delta C_T$ a partir dos valores de C_T obtidos após normalização com o controle endógeno 16S. As barras representam a média dos níveis de expressão relativa da *L. biflexa* sorovar Patoc-LIC11111 (em duplicata), *L. biflexa* sorovar Patoc-LIC11112 (em duplicata) e *L. biflexa* sorovar Patoc-LIC20143 (em duplicata) e *L. biflexa* sorovar Patoc selvagem em relação a estirpe atenuada ± o desvio padrão

Baseados nos resultados obtidos das *L. biflexa* recombinantes, apesar de se observar transcritos em quantidade maior do que comparada com a estirpe M20, para os genes LIC11112 e LIC20143 não foi possível observar expressão proteica quando submetidos a um ensaio de *western blotting*. Diversas estratégias de clonagem e diversos promotores foram empregadas a fim de tentar obter uma construção onde fosse possível observar expressão proteica (**Figura *67***). Pode-se inferir que algum mecanismo de regulação bacteriano impeça que os transcritos sejam traduzidos.

Figura 67 - *Western blottting* para avaliação da expressão das proteínas codificadas pelos genes da LIC1111, LIC11112 e LIC20143 na *L. biflexa*



Avaliação da expressão de LIC11111, LIC11112 e LIC20143 por *western blotting* por extrato celular total. A detecção foi feita utilizando anti-soro anti-LIC11111, anti-LIC11112 e anti-LIC20143 (1: 500) mais anticorpo anti-camundongo conjugado com HRP (1:5000). O controle positivo foi feito com a proteína recombinante purificada (exceto para LIC11111, pois não foi possível purificar a proteína novamente).

5. CONCLUSÕES

As proteínas codificadas pelos genes LIC11111, LIC11112 e LIC20143 foram escolhidas para este trabalho por serem da família de proteínas do tipo HtrA, um grupo já estudado em outros microrganismos como *B. burgderfori*, *H. pylori*, *E. coli*, entre outros, como sendo capazes de interagir com componentes da matriz extracelular e também degradá-los.

As análises de bioinformática indicam que as proteínas codificadas pelos genes LIC11112 e LIC20143 possuem uma região de serino-protease, tendo inclusive uma tríade catalítica bem definida (His-Asp-Ser). Entretanto, nos ensaios realizados com a rLIC20143 somente o ensaio de degradação de caseína total demonstrou uma possível atividade de enzima, sendo que os outros dois ensaios (degradação de L-BAPA e FITC-caseína) não foi possível observar atividade enzimática.

Os ensaios realizados para a proteína recombinante LIC20143 de *L. interrogans* demonstra que ela provavelmente é exportada para a superfície da bactéria, conforme resultados obtidos a partir de ensaios de localização como imunofluorescência e imunoensaio por ELISA. As proteínas rLIC111112 e rLIC20143 apresentaram ligações com diversos componentes da matriz extracelular e plasma, como plasminogênio, laminina, C4BP, trombina para ambas proteínas e também fibrinogênio para rLIC11112, que podem contribuir no processo de adesão, disseminação e colonização, auxiliando o patógeno no processo de infecção.

A interação das proteínas rLIC20143 e rLIC111112 com o plasminogênio e a capacidade de ter este convertido em plasmina (forma ativa) enquanto ligado as proteínas, podem auxiliar a bactéria a se tornar um organismo proteolítico, facilitando a evasão imune.

A LIC20143 apresentou um reconhecimento de anticorpos em pacientes diagnosticados com leptospirose tanta em MAT- (antes da soroconversão), quanto em MAT+, o que indica que essa proteína pode estar sendo expressa durante o processo de infecção.

Dessa maneira, os ensaios aqui mostrados e discutidos indicam que as proteínas têm um papel importante durante a infecção da leptospira e podem auxiliar a bactéria a escapar do sistema imune e estabelecer a doença.

Para análises em um ambiente vivo, a estratégia de expressão heteróloga em *L. biflexa* foi empregada e, apesar dessa técnica já estar bem estabelecida pelo nosso

grupo, não foi possível obter a expressão proteica dos genes da LIC11111, LIC11112 e LIC20143 fusionados ao vetor pMaORI em *L. biflexa*, tanto usando o promotor constitutivo da *lipL32* quanto utilizando da *lipL21,* apesar de apresentarem transcitos nos ensaios de RT-PCR. Provavelmente as proteínas podem ser submetidas a algum mecanismo de regulação da bactéria que impeça a expressão.

REFERÊNCIAS

ABFALTER, C. M.; SCHUBERT, M.; GÖTZ, C.; SCHMIDT, T. P.; POSSELT, G.; WESSLER, S. HtrA-mediated E-cadherin cleavage is limited to DegP and DegQ homologs expressed by gram-negative pathogens. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 30, 2016.

ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 172, n. 3–4, p. 353–358, 2014.

ADLER, B. Vaccines Against Leptospirosis. In: [s.l: s.n.].

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. **Leptospira and leptospirosis**, 2010.

AGAMPODI, S. B.; NUGEGODA, D. B.; THEVANESAM, V.; VINETZ, J. M. Characteristics of Rural Leptospirosis Patients Admitted to Referral Hospitals During the 2008 Leptospirosis Outbreak in Sri Lanka: Implications for Developing Public Health Control Measures. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 92, n. 1, 2015.

ALT, D. P.; WILSON-WELDER, J. H.; BAYLES, D. O.; CAMERON, C.; ADLER, B.; BULACH, D. M.; SEEMANN, T.; LEHANE, M. J.; HAINES, L. R.; DARBY, A. C.; HALL, N.; RADFORD, A. D.; ZUERNER, R. L. Complete Genome Sequence of Leptospira interrogans Serovar Bratislava, Strain PigK151. **Genome Announcements**, [s. l.], v. 3, n. 3, 2015.

ATZINGEN, M. V.; GÓMEZ, R. M.; SCHATTNER, M.; PRETRE, G.; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. **Journal of Infection**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 264–276, 2009.

ATZINGEN, M. V.; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; ARAÚJO, E. R.; DE BRITO, T.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with Leptospira interrogans. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 59, n. 9, 2010.

ATZINGEN, M. V.; VIEIRA, M. L.; OLIVEIRA. R.; DOMINGOS, R. F.; MENDES, R. S.; BARROS, A. T.; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; SILVIO A VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Evaluation of Immunoprotective Activity of Six Leptospiral Proteins in the Hamster Model of Leptospirosis. **The Open Microbiology Journal**, [s. l.], v. 6, n. 1, 2012.

ATZINGEN, M. V; BARBOSA, A. S.; DE BRITO, T.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; LIMA, D. M.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 8:70, 2008.

AYRAL, F. La leptospirose dans les cheptels bovins laitiers en France: impact économique de l'infection. **Bulletin GTV**, [s. l.], v. 69, p. 61–67, 2013.

BACKERT, S.; BERNEGGER, S.; SKÓRKO-GLONEK, J.; WESSLER, S. Extracellular

HtrA serine proteases: An emerging new strategy in bacterial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 20, p. e12845, 2018.

BAJANI, M. D.; ASHFORD, D. A.; BRAGG, S. L.; WOODS, C. W.; AYE, T.; SPIEGEL, R. A.; PLIKAYTIS, B. D.; PERKINS, B. A.; PHELAN, M.; LEVETT, P. N.; WEYANT, R. S. Evaluation of Four Commercially Available Rapid Serologic Tests for Diagnosis of Leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 41, n. 2, 2003.

BALLARD, S. A.; WILLIAMSON, M.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. Interactions of virulent and avirulent leptospires with primary cultures of renal epithelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 59–67, 1986.

BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A. E.; NEVES, F. O.; ATZINGEN, M. V.; WATANABE, M. M.; VIEIRA, M. L.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. A Newly Identified Leptospiral Adhesin Mediates Attachment to Laminin. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 74, n. 11, p. 6356–64, 2006.

BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A. E.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; SILVA, A. S.; DAHA, M. R.; ISAAC, L. Immune Evasion of *Leptospira* Species by Acquisition of Human Complement Regulator C4BP. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 1137–1143, 2009.

BARBOSA, A. S.; MONARIS, D.; SILVA, L. B.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CIANCIARULLO, A. M.; ISAAC, L.; ABREU, P. A. E. Functional Characterization of LcpA, a Surface-Exposed Protein of *Leptospira* spp. That Binds the Human Complement Regulator C4BP. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 78, n. 7, 2010.

BASHIRU, G.; BAHAMAN, A. Advances & challenges in leptospiral vaccine development. **Indian Journal of Medical Research**, [s. l.], v. 147, n. 1, p. 15–22, 2018.

BAUBY, H.; SAINT GIRONS, I.; PICARDEAU, M. Construction and complementation of the first auxotrophic mutant in the spirochaete *Leptospira meyeri*. **Microbiology**, [s. l.], v. 149, n. 3, p. 689–693, 2003.

BHANDARI, P.; GOWRISHANKAR, J. An Escherichia coli host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 179, n. 13, 1997.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 3, p. 757–771, 2003.

BOEHM, M.; HAENEL, I.; HOY, B.; BRØNDSTED, L.; SMITH, T. G.; HOOVER, T.; WESSLER, S.; TEGTMEYER, N. Extracellular secretion of protease HtrA from Campylobacter jejuni is highly efficient and independent of its protease activity and flagellum. **European Journal of Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 3, p. 163–173, 2013.

BOEHM, M.; HOY, B.; ROHDE, M.; TEGTMEYER, N.; BÆK, K. T.; OYARZABAL, O. A.; BRØNDSTED, L.; WESSLER, S.; BACKERT, S. Rapid paracellular transmigration of Campylobacter jejuni across polarized epithelial cells without affecting TER: Role of

proteolytic-active HtrA cleaving E-cadherin but not fibronectin. **Gut Pathogens**, [s. l.], v. 4, p. 3, 2012.

BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to Leptospira borgpetersenii serovar hardjo. **American Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 62, n. 7, p. 995–1000, 2001.

BONHOMME, D.; SANTECCHIA, I.; VERNEL-PAUILLAC, F.; CAROFF, M.; GERMON, P.; MURRAY, G.; ADLER, B.; BONECA, I. G.; WERTS, C. Leptospiral LPS escapes mouse TLR4 internalization and TRIF-associated antimicrobial responses through O antigen and associated lipoproteins. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 8, 2020.

BOURHY, P.; LOUVEL, H.; SAINT GIRONS, I.; PICARDEAU, M. Random Insertional Mutagenesis of *Leptospira interrogans* , the Agent of Leptospirosis, Using a *mariner* Transposon. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 187, n. 9, 2005.

BRETT-MAJOR, D. M.; COLDREN, R. Antibiotics for leptospirosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], 2012.

BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome reduction in Leptospira borgpetersenii reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 39, p. 14560–14565, 2006.

CARVALHO, E.; BARBOSA, A. S.; GÓMEZ, R. M.; CIANCIARULLO, A. M.; HAUK, P.; ABREU, P. A.; FIORINI, L. C.; OLIVEIRA, M. L. S.; ROMERO, E. C.; GONÇALES, A. P.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HO, P. L. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 583, n. 8, 2009.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; FRAGA, T. R.; SILVA, L. B. Da; MONARIS, D.; ABREU, P. A. E.; STROBEL, S.; JÓZSI, M.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S. Leptospiral Immunoglobulin-like Proteins Interact With Human Complement Regulators Factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 205, n. 6, p. 995–1004, 2012.

CAVENAGUE, M. F.; TEIXEIRA, A. F.; FILHO, A. S.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; HEINEMANN, M. B.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Characterization of a novel protein of *Leptospira interrogans* exhibiting plasminogen, vitronectin and complement binding properties. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 309, n. 2, p. 116–129, 2019.

CHAPPEL, R. J.; GORIS, M.; PALMER, M. F.; HARTSKEERL, R. A. Impact of Proficiency Testing on Results of the Microscopic Agglutination Test for Diagnosis of Leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 12, 2004.

CHASSIN, C.; PICARDEAU, M.; GOUJON, J.-M.; BOURHY, P.; QUELLARD, N.; DARCHE, S.; BADELL, E.; D'ANDON, M. F.; WINTER, N.; LACROIX-LAMANDÉ, S.;

BUZONI-GATEL, D.; VANDEWALLE, A.; WERTS, C. TLR4- and TLR2-Mediated B Cell Responses Control the Clearance of the Bacterial Pathogen, *Leptospira interrogans*. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 183, n. 4, 2009.

CHAVAKIS, T.; WIECHMANN, K.; PREISSNER, K. T.; HERRMANN, M. Staphylococcus aureus interactions with the endothelium. The role of bacterial "Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. **Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], 2005.

CHEN, H.-W.; TILLEY, D. H.; CANAL, E.; GUEVARA, C.; MAVES, R.; HALL, E.; HALSEY, E. S.; ZHANG, Z.; CHING, W.-M.; KOCHEL, T. J. Detection of Leptospira-Specific Antibodies Using a Recombinant Antigen-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 89, n. 6, 2013.

CHEN, H.-W.; TILLEY, D. H.; HALL, E.; LUKAS, H.; KOCHEL, T. J.; WEISSENBERGER, G.; HALSEY, E. S.; CANAL, E.; MAVES, R. C.; BECKER, K.; KUO, L.; CHING, W.-M.; GUEVARA, C. An Improved Enzyme-Linked Immunoassay for the Detection of Leptospira-Specific Antibodies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 99, n. 2, 2018.

CHENG, J.; QIN, J.; XIE, G. [Epidemiological observation on effect of Leptospiral outer membrane vaccine]. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, [s. l.], v. 22, p. 108–110, 2001.

CHOU, L.-F.; CHEN, Y.-T.; LU, C.-W.; KO, Y.-C.; TANG, C.-Y.; PAN, M.-J.; TIAN, Y.-C.; CHIU, C.-H.; HUNG, C.-C.; YANG, C.-W. Sequence of Leptospira santarosai serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. **Gene**, [s. l.], v. 511, n. 2, 2012.

CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L.; MØLLER, A. K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Physiological Osmotic Induction of *Leptospira interrogans* Adhesion: LigA and LigB Bind Extracellular Matrix Proteins and Fibrinogen. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 75, n. 5, p. 2441–2450, 2007.

CINCO, M. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. **New Microbiologica**, [s. l.], v. 33, p. 283–292, 2010.

CLAUSEN, T.; KAISER, M.; HUBER, R.; EHRMANN, M. Htra proteases: Regulated proteolysis in protein quality control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 12, p. 152–162, 2011.

CLAUSEN, T.; SOUTHAN, C.; EHRMANN, M. The HtrA Family of Proteases. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 443–455, 2002.

COLEMAN, J. L.; BENACH, J. L. Use of the plasminogen activation system by microorganisms. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, [s. l.], v. 134, n. 6, 1999.

COLEMAN, J. L.; CROWLEY, J. T.; TOLEDO, A. M.; BENACH, J. L. The HtrA protease of Borrelia burgdorferi degrades outer membrane protein BmpD and chemotaxis phosphatase CheX. **Molecular Microbiology**, [s. l.], 2013.

COLEMAN, J. L.; SELLATI, T. J.; TESTA, J. E.; KEW, R. R.; FURIE, M. B.; BENACH, J. L. Borrelia burgdorferi binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 63, n. 7, 1995.

COLEMAN, J. L.; TOLEDO, A.; BENACH, J. L. HtrA of Borrelia burgdorferi leads to decreased swarm motility and decreased production of pyruvate. **mBio**, [s. l.], v. 9, p. e01136-18, 2018.

CONRAD, N. L.; CRUZ MCBRIDE, F. W.; SOUZA, J. D.; SILVEIRA, M. M.; FÉLIX, S.; MENDONÇA, K. S.; SANTOS, C. S.; ATHANAZIO, D. A.; MEDEIROS, M. A.; REIS, M. G.; DELLAGOSTIN, O. A.; MCBRIDE, A. J. A. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 3, 2017.

COSTA, F.; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TORGERSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M. S.; STEIN, C.; ABELA-RIDDER, B.; KO, A. I. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 9, p. e0003898, 2015.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; ADLER, B. LipL21 Is a Novel Surface-Exposed Lipoprotein of Pathogenic *Leptospira* Species. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 2414–2421, 2003.

CUMBERLAND, P.; EVERARD, C. O.; LEVETT, P. N. Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 61, n. 5, 1999.

DA CUNHA, C. E. P.; BETTIN, E. B.; BAKRY, A. F. A. A. Y.; SEIXAS NETO, A. C. P.; AMARAL, M. G.; DELLAGOSTIN, O. A. Evaluation of different strategies to promote a protective immune response against leptospirosis using a recombinant LigA and LigB chimera. **Vaccine**, [s. l.], v. 37, n. 13, 2019.

DA SILVA, L. B.; MIRAGAIA, L. dos S.; BREDA, L. C. D.; ABE, C. M.; SCHMIDT, M. C. B.; MORO, A. M.; MONARIS, D.; CONDE, J. N.; JÓZSI, M.; ISAAC, L.; ABREU, P. A. E.; BARBOSA, A. S. Pathogenic *Leptospira* Species Acquire Factor H and Vitronectin via the Surface Protein LcpA. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 888–897, 2015.

DAHER, E. de F.; NOGUEIRA, C. B. Evaluation of penicillin therapy in patients with leptospirosis and acute renal failure. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 327–332, 2000.

DAROZ, B. B.; FERNANDES, L. G. V.; TEIXEIRA, A. F.; NASCIMENTO, A. L. T. O. In Silico Structural and Functional Characterization of HtrA Proteins of Leptospira spp.: Possible Implications in Pathogenesis. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 5, n. 4, 2020.

DE MARTINO, C.; BRUNI, C. B.; BELLOCCI, M.; NATALI, P. G. Spontaneous leptospiral infection of the rat kidney. An ultrastructural study. **Experimental and Molecular Pathology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 27–38, 1969.

DEMARRE, G.; GUÉROUT, A.-M.; MATSUMOTO-MASHIMO, C.; ROWE-MAGNUS, D. A.; MARLIÈRE, P.; MAZEL, D. A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPα) conjugative machineries and their cognate Escherichia coli host strains. **Research in Microbiology**, [s. l.], v. 156, n. 2, 2005.

DOMINGOS, R. F.; ROMERO, E. C.; FERNANDES, L. G.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Novel *Leptospira interrogans* protein Lsa32 is expressed during infection and binds laminin and plasminogen. **Microbiology**, [s. l.], v. 161, n. 4, p. 851–864, 2015.

DOMINGOS, R. F.; VIEIRA, M. L.; ROMERO, E. C.; GONÇALES, A.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2012.

DOOLITTLE, R. F. Fibrinogen and Fibrin. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

DRAGHI, M. G.; BRIHUEGA, B.; BENÍTEZ, D.; SALA, J. M.; BIOTTI, G. M.; PEREYRA, M.; HOMSE, A.; GUARINIELLO, L. [Leptospirosis outbreak in calves from Corrientes Province, Argentina]. **Rev Argent Microbiol** , [s. l.], v. 43, n. 1, p. 42–4, 2011.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 95, n. 2, 1961.

ESLABÃO, M. R.; KREMER, F. S.; RAMOS, R. T. J.; SILVA, A. L. da C. Da; AZEVEDO, V. A. de C.; PINTO, L. da S.; SILVA, É. F. Da; DELLAGOSTIN, O. A. Genome of Leptospira borgpetersenii strain 4E, a highly virulent isolate obtained from Mus musculus in southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 113, n. 2, 2018.

EVANGELISTA, K.; FRANCO, R.; SCHWAB, A.; COBURN, J. *Leptospira interrogans* Binds to Cadherins. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. e2672, 2014.

EVANGELISTA, K. V.; LOURDAULT, K. Evaluation of Vaccine Candidates against Leptospirosis using Golden Syrian Hamsters. In: [s.l: s.n.].

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. (eds. Leptospira and Leptospirosis (2nd edition). **Book, MedSci, Armadale, Australia**, [s. l.], 1999.

FERNANDES, L. G.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. *Leptospira interrogans* reduces fibrin clot formation by modulating human thrombin activity via exosite I. **Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 73, n. 4, 2015.

FERNANDES, L. G.; SIQUEIRA, G. H.; TEIXEIRA, A. R. F.; SILVA, L. P.; FIGUEREDO, J. M.; COSATE, M. R.; VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Leptospira spp.: Novel insights into host–pathogen interactions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 176, p. 50–57, 2016.

FERNANDES, L. G. V.; TEIXEIRA, A. F.; FILHO, A. F. S.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; HEINEMANN, M. B.; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Immune response and protective profile elicited by a multi-epitope chimeric protein derived from Leptospira interrogans. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 57, 2017.

FERNANDES, L. G. V.; GUAMAN, L. P.; VASCONCELLOS, S. A.; HEINEMANN, M. B.; PICARDEAU, M.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Gene silencing based on RNA-guided catalytically inactive Cas9 (dCas9): a new tool for genetic engineering in Leptospira. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019.

FERNANDES, L. G. V.; HORNSBY, R. L.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; NALLY, J. E. Genetic manipulation of pathogenic *Leptospira*: CRISPR interference (CRISPRi)-mediated gene silencing and rapid mutant recovery at 37 °C. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2021.

FERNANDES, L. G. V.; VIEIRA, M. L.; ALVES, I. J.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Functional and immunological evaluation of two novel proteins of *Leptospira* spp. **Microbiology**, [s. l.], v. 160, n. 1, p. 149–164, 2014.

FERNANDES, L. G. V.; VIEIRA, M. L.; KIRCHGATTER, K.; ALVES, I. J.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. T. O. OmpL1 Is an Extracellular Matrix- and Plasminogen-Interacting Protein of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 80, n. 10, p. 3679–3692, 2012.

FIGUEIRA, C.; CRODA, J.; CHOY, H. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. Heterologous expression of pathogen-specific genes ligA and ligB in the saprophyte *Leptospira biflexa* confers enhanced adhesion to cultured cells and fibronectin. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2011.

FIGUEREDO, J. M.; SIQUEIRA, G. H.; DE SOUZA, G. O.; HEINEMANN, M. B.; VASCONCELLOS, S. A.; CHAPOLA, E. G. B.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Characterization of two new putative adhesins of Leptospira interrogans. **Microbiology**, [s. l.], v. 163, n. 1, p. 37–51, 2017.

FLANNERY, B.; COSTA, D.; CARVALHO, F. P.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; DA SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G. P.; RILEY, L. W.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. Evaluation of Recombinant Leptospira Antigen-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Serodiagnosis of Leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 9, 2001.

FOUTS, D. E.; MATTHIAS, M. A.; ADHIKARLA, H.; ADLER, B.; AMORIM-SANTOS, L.; BERG, D. E.; BULACH, D.; BUSCHIAZZO, A.; CHANG, Y. F.; GALLOWAY, R. L.; HAAKE, D. A.; HAFT, D. H.; HARTSKEERL, R.; KO, A. I.; LEVETT, P. N.; MATSUNAGA, J.; MECHALY, A. E.; MONK, J. M.; NASCIMENTO, A. L. T.; NELSON, K. E.; PALSSON, B.; PEACOCK, S. J.; PICARDEAU, M.; RICALDI, J. N.; THAIPANDUNGPANIT, J.; WUNDER, E. A.; YANG, X. F.; ZHANG, J. J.; VINETZ, J. M. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?:Comparative Genomic Analysis of the Genus Leptospira. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, p. e0004403, 2016.

FREES, D.; BRØNDSTED, L.; INGMER, H. Bacterial proteases and virulence. **Subcellular Biochemistry**, [s. l.], v. 66, p. 161–192, 2013.

GAMBERINI, M.; GÃ³MEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A. L.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 244, n. 2, 2005.

GASTEIGER, J. Chemoinformatics: a new field with a long tradition. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 384, n. 1, 2006.

GHERARDINI, F. C. Borrelia burgdorferi HtrA may promote dissemination and irritation. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 209–213, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mmi.12390>

GHOSH, K. K.; PRAKASH, A.; DHARA, A.; HUSSAIN, M. S.; SHRIVASTAV, P.; KUMAR, P.; BALAMURUGAN, V.; KUMAR, M. Role of Supramolecule ErpY-Like Lipoprotein of *Leptospira* in Thrombin-Catalyzed Fibrin Clot Inhibition and Binding to Complement Factors H and I, and Its Diagnostic Potential. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 87, n. 12, p. e00536-19, 2019.

GHOSH, K. K.; PRAKASH, A.; SHRIVASTAV, P.; BALAMURUGAN, V.; KUMAR, M. Evaluation of a novel outer membrane surface-exposed protein, LIC13341 of Leptospira, as an adhesin and serodiagnostic candidate marker for leptospirosis. **Microbiology**, [s. l.], v. 164, n. 8, 2018.

GIRONS, I. Saint; BOURHY, P.; OTTONE, C.; PICARDEAU, M.; YELTON, D.; HENDRIX, R. W.; GLASER, P.; CHARON, N. The LE1 Bacteriophage Replicates as a Plasmid within *Leptospira biflexa* : Construction of an *L. biflexa-Escherichia coli* Shuttle Vector. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 182, n. 20, p. 5700–5705, 2000.

GORIS, M. G. A.; HARTSKEERL, R. A. Leptospirosis Serodiagnosis by the Microscopic Agglutination Test. **Current Protocols in Microbiology**, [s. l.], v. 32, n. 1, 2014.

GOTTESMAN, S. Proteases and their targets in Escherichia coli. **Annual Review of Genetics**, [s. l.], v. 30, p. 465–506, 1996.

GRASSMANN, A. A.; KREMER, F. S.; DOS SANTOS, J. C.; SOUZA, J. D.; PINTO, L. da S.; MCBRIDE, A. J. A. Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 8, 2017.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 6, 2006.

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

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, [s. l.], v. 146, n. 7, 2000.

HAAKE, D. A.; DUNDOO, M.; CADER, R.; KUBAK, B. M.; HARTSKEERL, R. A.; SEJVAR, J. J.; ASHFORD, D. A. Leptospirosis, Water Sports, and Chemoprophylaxis. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 34, n. 9, 2002.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in Humans. In: [s.l: s.n.].

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the Leptospiral Outer Membrane and Description of Three Novel Leptospiral Membrane Proteins. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 70, n. 9, p. 4936–4945, 2002.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Leptospira: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular Microbiology**, [s. l.], 2010.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41 Exhibit Synergistic Immunoprotection. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 67, n. 12, 1999.

HAAKE, D. A.; ZÜCKERT, W. R. The Leptospiral Outer Membrane. In: [s.l: s.n.].

HANAHAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 166, n. 4, 1983.

HANSEN, G.; HILGENFELD, R. Architecture and regulation of HtrA-family proteins involved in protein quality control and stress response. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 70, n. 5, p. 761–775, 2013.

HARRER, A.; BOEHM, M.; BACKERT, S.; TEGTMEYER, N. Overexpression of serine protease HtrA enhances disruption of adherens junctions, paracellular transmigration and type IV secretion of CagA by Helicobacter pylori. **Gut Pathogens**, [s. l.], v. 9, p. 40, 2017.

HOKE, D. E.; EGAN, S.; CULLEN, P. A.; ADLER, B. LipL32 Is an Extracellular Matrix-Interacting Protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 76, n. 5, p. 2063–2069, 2008.

HOY, B.; GEPPERT, T.; BOEHM, M.; REISEN, F.; PLATTNER, P.; GADERMAIER, G.; SEWALD, N.; FERREIRA, F.; BRIZA, P.; SCHNEIDER, G.; BACKERT, S.; WESSLER, S. Distinct Roles of Secreted HtrA Proteases from Gram-negative Pathogens in Cleaving the Junctional Protein and Tumor Suppressor E-cadherin. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 287, n. 13, p. 10115–10120, 2012.

HOY, B.; LÖWER, M.; WEYDIG, C.; CARRA, G.; TEGTMEYER, N.; GEPPERT, T.; SCHRÖDER, P.; SEWALD, N.; BACKERT, S.; SCHNEIDER, G.; WESSLER, S. Helicobacter pylori HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. **EMBO Reports**, [s. l.], v. 11, p. 798–804, 2010.

HULL-JACKSON, C.; GLASS, M. B.; ARI, M. D.; BRAGG, S. L.; BRANCH, S. L.; WHITTINGTON, C. U.; EDWARDS, C. N.; LEVETT, P. N. Evaluation of a Commercial Latex Agglutination Assay for Serological Diagnosis of Leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 5, 2006.

INGMER, H.; BRØNDSTED, L. Proteases in bacterial pathogenesis. **Research in Microbiology**, [s. l.], v. 160, p. 704–710, 2009.

ITO, T.; YANAGAWA, R. Leptospiral attachment to extracellular matrix of mouse fibroblast (L929) cells. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 1–2, p. 89–96, 1987.

JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G. Differentiation of Pathogenic and Saprophytic Leptospires I. Growth at Low Temperatures. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 94, n. 1, 1967.

JORGE, S.; KREMER, F. S.; OLIVEIRA, N. R. De; NAVARRO, G. de O. S. V.; GUIMARÃES, A. M.; SANCHEZ, C. D.; WOLOSKI, R. D. dos S.; RIDIERI, K. F.; CAMPOS, V. F.; PINTO, L. da S.; DELLAGOSTIN, O. A. Whole-genome sequencing of Leptospira interrogans from southern Brazil: genetic features of a highly virulent strain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 113, n. 2, 2018.

JORGE, S.; MIOTTO, B. A.; KREMER, F. S.; CAGLIARI, R.; DE OLIVEIRA, N. R.; HEINEMANN, M. B.; DA SILVA PINTO, L.; HAGIWARA, M. K.; CAMPOS, V. F.; DELLAGOSTIN, O. A. Complete genome sequence and in silico analysis of L. interrogans Canicola strain DU114: A virulent Brazilian isolate phylogenetically related to serovar Linhai. **Genomics**, [s. l.], v. 111, n. 6, 2019.

JUNCKER, A. S.; WILLENBROCK, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S.; NIELSEN, H.; KROGH, A. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. **Protein Science**, [s. l.], v. 12, n. 8, 2003.

KAMENI, A.-P. T.; COUTURE-TOSI, E.; SAINT-GIRONS, I.; PICARDEAU, M. Inactivation of the Spirochete *recA* Gene Results in a Mutant with Low Viability and Irregular Nucleoid Morphology. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 184, n. 2, 2002.

KARIU, T.; YANG, X.; MARKS, C. B.; ZHANG, X.; PAL, U. Proteolysis of BB0323 results in two polypeptides that impact physiologic and infectious phenotypes in *Borrelia burgdorferi*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 510–522, 2013.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [s. l.], v. 1751, n. 2, 2005.

KIM, D. Y.; KIM, K. K. Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. **Journal of biochemistry and molecular biology**, [s. l.], v. 38, p. 266–274, 2005.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 10, 2009.

KOCHI, L. T.; FERNANDES, L. G. V.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Heterologous Expression of the Pathogen-Specific LIC11711 Gene in the Saprophyte L. biflexa Increases Bacterial Binding to Laminin and Plasminogen. **Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 8, 2020.

KOCHI, L. T.; FERNANDES, L. G. V.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.;

HEINEMANN, M. B.; ROMERO, E. C.; KIRCHGATTER, K.; NASCIMENTO, A. L. T. O. The interaction of two novel putative proteins of *Leptospira interrogans* with E-cadherin, plasminogen and complement components with potential role in bacterial infection. **Virulence**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2019.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, [s. l.], v. 22, n. 11–12, 2004.

KORESSAAR, T.; REMM, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 1289–1291, 2007.

KRISTENSEN, J. H.; KARSDAL, M. A. Elastin. In: **Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin**. [s.l.] : Elsevier, 2016.

KROJER, T.; SAWA, J.; SCHÄFER, E.; SAIBIL, H. R.; EHRMANN, M.; CLAUSEN, T. Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. **Nature**, [s. l.], v. 453, n. 7197, p. 885–890, 2008.

KUMARI, A.; PREMLATHA, M. M.; RAJA, V.; AKINO MERCY, C. S.; SUMATHI, K.; SHARIFF, M.; NATARAJASEENIVASAN, K. Protective immunity of recombinant LipL21 and I-LipL21 against Leptospira interrogans serovar Autumnalis N2 infection. **The Journal of Infection in Developing Countries**, [s. l.], v. 12, n. 01, 2018.

LÄHTEENMÄKI, K.; KUKKONEN, M.; KORHONEN, T. K. The Pla surface protease/adhesin of *Yersinia pestis* mediates bacterial invasion into human endothelial cells. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 504, n. 1–2, 2001.

LAURICHESSE, H.; GOURDON, F.; SMITS, H. L.; ABDOE, T. H.; ESTAVOYER, J. M.; REBIKA, H.; POULIQUEN, P.; CATALINA, P.; DUBRAY, C.; BEYTOUT, J. Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae in healthy volunteers. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 13, n. 4, 2007.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], p. 296–326, 2001.

LEVETT, P. N. Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 36, n. 4, 2003.

LILENBAUM, W.; MARTINS, G. Leptospirosis in Cattle: A Challenging Scenario for the Understanding of the Epidemiology. **Transboundary and Emerging Diseases**, [s. l.], v. 61, p. 63–68, 2014.

LIN, X.; XIAO, G.; LUO, D.; KONG, L.; CHEN, X.; SUN, D.; YAN, J. Chimeric epitope vaccine against Leptospira interrogans infection and induced specific immunity in guinea pigs. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2016.

LIN, Y.-P.; LEE, D.-W.; MCDONOUGH, S. P.; NICHOLSON, L. K.; SHARMA, Y.; CHANG, Y.-F. Repeated Domains of Leptospira Immunoglobulin-like Proteins Interact with Elastin and Tropoelastin. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 284, n. 29, p. 19380–19391, 2009.

LIN, Y.-P.; MCDONOUGH, S. P.; SHARMA, Y.; CHANG, Y.-F. Leptospira immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen αC domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 79, n. 4, 2011.

LJUNGH, Å.; MORAN, A. P.; WADSTRÖM, T. Interactions of bacterial adhesins with extracellular matrix and plasma proteins: pathogenic implications and therapeutic possibilities. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 2, 1996.

LLANOS SALINAS, S. P.; CASTILLO SÁNCHEZ, L. O.; CASTAÑEDA MIRANDA, G.; RODRÍGUEZ REYES, E. A.; ORDOÑEZ LÓPEZ, L.; MENA BAÑUELOS, R.; ALCARAZ SOSA, L. E.; NÚÑEZ CARRERA, M. G.; JOSÉ MANUEL, R. O.; CARMONA GASCA, C. A.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A.; CANDANOSA ARANDA, I. E.; DE LA PEÑA-MOCTEZUMA, A. GspD, The Type II Secretion System Secretin of Leptospira, Protects Hamsters against Lethal Infection with a Virulent L. interrogans Isolate. **Vaccines**, [s. l.], v. 8, n. 4, 2020.

LONGHI, M. T.; OLIVEIRA, T. R.; ROMERO, E. C.; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 58, n. 10, p. 1275–1282, 2009.

LOUVEL, H.; PICARDEAU, M. Genetic Manipulation of *Leptospira biflexa*. **Current Protocols in Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2007.

LÖWER, M.; WEYDIG, C.; METZLER, D.; REUTER, A.; STARINZKI-POWITZ, A.; WESSLER, S.; SCHNEIDER, G. Prediction of extracellular proteases of the human pathogen Helicobacter pylori reveals proteolytic activity of the Hp1018/19 protein HtrA. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 3, p. e3510, 2008.

MACIEL, E. A. P.; DE CARVALHO, A. L. F.; NASCIMENTO, S. F.; DE MATOS, R. B.; GOUVEIA, E. L.; REIS, M. G.; KO, A. I. Household Transmission of Leptospira Infection in Urban Slum Communities. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2008.

MALMSTRÖM, J.; BECK, M.; SCHMIDT, A.; LANGE, V.; DEUTSCH, E. W.; AEBERSOLD, R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen Leptospira interrogans. **Nature**, [s. l.], v. 460, p. 762–765, 2009.

MARSHALL, R. B. Ultrastructural Changes In Renal Tubules of Sheep Following Experimental Infection With *Leptospira interrogans* Serotype Pomona. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 505–508, 1974.

MARTELI, A. N.; GENRO, L. V.; DIAMENT, D.; GUASSELLI, L. A. Análise espacial da leptospirose no Brasil. **Saúde em Debate**, [s. l.], v. 44, n. 126, 2020.

MARTÍNEZ, R.; PÉREZ, A.; QUIÑONES, M. del C.; CRUZ, R.; ÁLVAREZ, Á.; ARMESTO, M.; FERNÁNDEZ, C.; MENÉNDEZ, J.; RODRÍGUEZ, I.; BARÓ, M.; DÍAZ, M.; RODRÍGUEZ, J.; SIERRA, G.; OBREGÓN, A. M.; TOLEDO, M. E.; FERNÁNDEZ, N. Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba. **Revista Panamericana de Salud Pública**, [s. l.], v. 15, n. 4, 2004.

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 112, p. 156–160, 2017.

MATSUNAGA, J.; WERNEID, K.; ZUERNER, R. L.; FRANK, A.; HAAKE, D. A. LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. **Microbiology**, [s. l.], v. 152, n. 12, p. 3777–3786, 2006.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 5, 2005.

MENDES, R. S.; VON ATZINGEN, M.; DE MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; SERRANO, S. M. T.; ASEGA, A. F.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. The Novel Leptospiral Surface Adhesin Lsa20 Binds Laminin and Human Plasminogen and Is Probably Expressed during Infection. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 79, n. 11, p. 4657–4667, 2011.

MERI, T.; MURGIA, R.; STEFANEL, P.; MERI, S.; CINCO, M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 139–147, 2005.

MILES, A. J.; WALLACE, B. A. Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 45, n. 18, 2016.

MILLER, N. G.; WILSON, R. B. Electron microscopic study of the relationship of Leptospira pomona to the renal tubules of the hamster during acute and chronic leptospirosis. **American Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 225–235, 1967.

MIURA, N.; SHAHEEN, S. M.; AKITA, H.; NAKAMURA, T.; HARASHIMA, H. A KALA-modified lipid nanoparticle containing CpG-free plasmid DNA as a potential DNA vaccine carrier for antigen presentation and as an immune-stimulative adjuvant. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 43, n. 3, 2015.

MORENO, L. Z.; MIRAGLIA, F.; KREMER, F. S.; ESLABAO, M. R.; DELLAGOSTIN, O. A.; LILENBAUM, W.; FREITAS, J. C.; VASCONCELLOS, S. A.; HEINEMANN, M. B.; MORENO, A. M. Comparative genomics of pathogenic Leptospira interrogans serovar Canicola isolated from swine and human in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 113, n. 2, 2018.

MURRAY, G. L.; MOREL, V.; CERQUEIRA, G. M.; CRODA, J.; SRIKRAM, A.; HENRY, R.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; BULACH, D. M.; SERMSWAN, R. W.; ADLER, B.; PICARDEAU, M. Genome-Wide Transposon Mutagenesis in Pathogenic *Leptospira* Species. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 77, n. 2, 2009.

NAHORI, M.-A.; FOURNIÉ-AMAZOUZ, E.; QUE-GEWIRTH, N. S.; BALLOY, V.; CHIGNARD, M.; RAETZ, C. R. H.; SAINT GIRONS, I.; WERTS, C. Differential TLR Recognition of Leptospiral Lipid A and Lipopolysaccharide in Murine and Human Cells. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 175, n. 9, 2005.

NASCIMENTO, A. L. T. O.; KO, A. I.; MARTINS, E. A. L.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.;

MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F. M.; LEITE, L. C. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E. S.; FERRO, M. I. T.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GÓES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S.; HARAKAVA, R.; JERÔNIMO, S. M. B.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; DE OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; REIS, M. S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J. G.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E. A.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. Comparative Genomics of Two Leptospira interrogans Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 186, p. 2164–2172, 2004. a.

NASCIMENTO, A. L. T. O.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E. A.; DIGIAMPIETRI, L. A.; HARSTKEERL, R. A.; HO, P. L.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; HAAKE, D. A.; MARTINS, E. A. L. Genome features of Leptospira interrogans serovar Copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 37, p. 459–477, 2004. b.

NDENGU, M.; DE GARINE-WICHATITSKY, M.; PFUKENYI, D. M.; TIVAPASI, M.; MUKAMURI, B.; MATOPE, G. Assessment of community awareness and risk perceptions of zoonotic causes of abortion in cattle at three selected livestock–wildlife interface areas of Zimbabwe. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 145, n. 7, p. 1304–1319, 2017.

NEVES, F. O.; ABREU, P. A. E.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Identification of a novel potential antigen for early-phase serodiagnosis of leptospirosis. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 188, n. 5, 2007.

NICODEMO, A. C.; DUARTE, M. I. S.; ALVES, V. A. F.; TAKAKURA, C. F. H.; SANTOS, R. T. M.; NICODEMO, E. L. Lung Lesions in Human Leptospirosis: Microscopic, Immunohistochemical, and Ultrastructural Features Related to Thrombocytopenia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 56, n. 2, 1997.

OLIVEIRA, R.; DE MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Characterization of Novel OmpA-Like Protein of *Leptospira interrogans* That Binds Extracellular Matrix Molecules and Plasminogen. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. e21962, 2011.

OLIVEIRA, R.; DOMINGOS, R. F.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; ALVES, I. J.; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Intermediate and C-terminal regions of leptospiral adhesin Lsa66 are responsible for binding with plasminogen and extracellular matrix components. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 9, p. 1119–1130, 2014.

OLIVEIRA, R.; DOMINGOS, R. F.; SIQUEIRA, G. H.; FERNANDES, L. G.; SOUZA, N. M.; VIEIRA, M. L.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Adhesins of *Leptospira interrogans* Mediate the Interaction to Fibrinogen and Inhibit Fibrin Clot Formation In Vitro. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 7,

n. 8, p. doi:10.1371/journal.pntd.0002396., 2013.

OLIVEIRA, T. L.; SCHUCH, R. A.; INDA, G. R.; ROLOFF, B. C.; NETO, A. C. P. S.; AMARAL, M.; DELLAGOSTIN, O. A.; HARTWIG, D. D. LemA and Erp Y-like recombinant proteins from Leptospira interrogans protect hamsters from challenge using AddaVax^{TM} as adjuvant. **Vaccine**, [s. l.], v. 36, n. 19, 2018.

OLIVEIRA, T. R.; LONGHI, M. T.; DE MORAIS, Z. M.; ROMERO, E. C.; BLANCO, R. M.; KIRCHGATTER, K.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Evaluation of Leptospiral Recombinant Antigens MPL17 and MPL21 for Serological Diagnosis of Leptospirosis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. **Clinical and Vaccine Immunology**, [s. l.], v. 15, n. 11, 2008.

OLIVEIRA, T. R.; LONGHI, M. T.; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 207–217, 2010.

OZURU, R.; SAITO, M.; KANEMARU, T.; MIYAHARA, S.; VILLANUEVA, S. Y. A. M.; MURRAY, G. L.; ADLER, B.; FUJII, J.; YOSHIDA, S. Adipose tissue is the first colonization site of Leptospira interrogans in subcutaneously infected hamsters. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. e0172973, 2017.

PALANIAPPAN, R. U.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y.-F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 3, 2007.

PALLEN, M. J.; WREN, B. W. The HtrA family of serine proteases. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 26, p. 209–221, 1997.

PANAPHUT, T.; DOMRONGKITCHAIPORN, S.; THINKAMROP, B. Prognostic factors of death in leptospirosis: a prospective cohort study in Khon Kaen, Thailand. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 6, n. 1, 2002.

PAPPAS, C. J.; BENAROUDJ, N.; PICARDEAU, M. A Replicative Plasmid Vector Allows Efficient Complementation of Pathogenic Leptospira Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 81, n. 9, 2015.

PAPPAS, C. J.; PICARDEAU, M. Control of Gene Expression in Leptospira spp. by Transcription Activator-Like Effectors Demonstrates a Potential Role for LigA and LigB in *Leptospira interrogans* Virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 81, n. 22, p. 7888–92, 2015.

PASSALIA, F. J.; CARVALHO, E.; HEINEMANN, M. B.; VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. T. O. The Leptospira interrogans LIC10774 is a multifunctional surface protein that binds calcium and interacts with host components. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 235, 2020.

PASSALIA, F. J.; HEINEMANN, M. B.; VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. T. O. A Novel Leptospira interrogans Protein LIC13086 Inhibits Fibrin Clot Formation and Interacts With Host Components. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2021.

PATTI, J. M.; HÖÖK, M. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. **Current Opinion in Cell Biology**, [s. l.], v. 6, n. 5, 1994.

PEI, J.; GRISHIN, N. V. PROMALS3D: Multiple protein sequence alignment enhanced with evolutionary and three-dimensional structural information. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 1079, p. 263–271, 2014.

PELISSARI, D. M.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ARSKY, M. de L. N. S.; NUNES, M. L. Revisão sistemática dos fatores associados à leptospirose no Brasil, 2000-2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s. l.], v. 20, n. 4, 2011.

PEREIRA, P. R. M.; FERNANDES, L. G. V.; DE SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; HEINEMANN, M. B.; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Multifunctional and Redundant Roles of *Leptospira interrogans* Proteins in Bacterial-Adhesion and fibrin clotting inhibition. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 307, n. 6, p. 297–310, 2017.

PICARDEAU, M. Conjugative Transfer between *Escherichia coli* and *Leptospira* spp. as a New Genetic Tool. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 319–322, 2008.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 15, p. 297–307, 2017.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 3, p. e1607, 2008.

PICARDEAU, M.; REN, S.; SAINT GIRONS, I. Killing Effect and Antitoxic Activity of the *Leptospira interrogans* Toxin-Antitoxin System in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 183, n. 21, 2001.

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 Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. e815, 2010.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of Leptospira spp. in humans. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 2, n. 10, 2000.

PLUNKETT, A. H.; GRAHAM, T. W.; FAMULA, T. R.; OBERBAUER, A. M. Effect of a monovalent vaccine against *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain hardjobovis on fertility in Holstein dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 242, n. 11, p. 1564–1572, 2013.

QUE-GEWIRTH, N. L. S.; RIBEIRO, A. A.; KALB, S. R.; COTTER, R. J.; BULACH, D. M.; ADLER, B.; GIRONS, I. Saint; WERTS, C.; RAETZ, C. R. H. A Methylated Phosphate Group and Four Amide-linked Acyl Chains in Leptospira interrogans Lipid A. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 24, 2004.

RAMOS, C. R. R.; ABREU, P. A. E.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; HO, P. L. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 37, n. 8, 2004.

REN, S.-X.; FU, G.; JIANG, X.-G.; ZENG, R.; MIAO, Y.-G.; XU, H.; ZHANG, Y.-X.; XIONG, H.; LU, G.; LU, L.-F.; JIANG, H.-Q.; JIA, J.; TU, Y.-F.; JIANG, J.-X.; GU, W.-Y.; ZHANG, Y.-Q.; CAI, Z.; SHENG, H.-H.; YIN, H.-F.; ZHANG, Y.; ZHU, G.-F.; WAN, M.; HUANG, H.-L.; QIAN, Z.; WANG, S.-Y.; MA, W.; YAO, Z.-J.; SHEN, Y.; QIANG, B.-Q.; XIA, Q.-C.; GUO, X.-K.; DANCHIN, A.; SAINT GIRONS, I.; SOMERVILLE, R. L.; WEN, Y.-M.; SHI, M.-H.; CHEN, Z.; XU, J.-G.; ZHAO, G.-P. Unique physiological and pathogenic features of Leptospira interrogans revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, [s. l.], v. 422, n. 6934, 2003.

RICALDI, J. N.; FOUTS, D. E.; SELENGUT, J. D.; HARKINS, D. M.; PATRA, K. P.; MORENO, A.; LEHMANN, J. S.; PURUSHE, J.; SANKA, R.; TORRES, M.; WEBSTER, N. J.; VINETZ, J. M.; MATTHIAS, M. A. Whole Genome Analysis of Leptospira licerasiae Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 6, n. 10, 2012.

RINEHART, C. L.; ZIMMERMAN, A. D.; BUTERBAUGH, R. E.; JOLIE, R. A.; CHASE, C. C. L. Efficacy of vaccination of cattle with the *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type hardjoprajitno component of a pentavalent *Leptospira* bacterin against experimental challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* type hardjo-bovis. **American Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 73, n. 5, p. 735–740, 2012.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; MCBRIDE, F. W. da C.; FIGUEIRA, C. P.; HUERRE, M.; AVE, P.; GIRONS, I. Saint; KO, A. I.; PICARDEAU, M. The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. e97, 2007.

RIVERA, J.; VANNAKAMBADI, G.; HÖÖK, M.; SPEZIALE, P. Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. **Thromb Haemost .**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 503–511, 2007.

RODRIGUES, C. Sobre leptospirose e informação: ampliando os conceitos de negligência em saúde. . **ABCS Health Science**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 45–49, 2017.

ROHDE, H.; WICK, G.; TIMPL, R. Immunochemical Characterization of the Basement Membrane Glycoprotein Laminin. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 102, n. 1, 1979.

ROSSINI, A. D.; TEIXEIRA, A. F.; SOUZA FILHO, A.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; HEINEMANN, M. B.; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Identification of a novel protein in the genome sequences of *Leptospira interrogans* with the ability to interact with host's components. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 163–175, 2020.

RUSSELL, K. L.; GONZALEZ, M. A. M.; WATTS, D. M.; LAGOS-FIGUEROA, R. C.; CHAUCA, G.; ORE, M.; GONZALEZ, J. E.; MORON, C.; TESH, R. B.; VINETZ, J. M. An outbreak of leptospirosis among Peruvian military recruits. **Am J Trop Med Hyg** , [s. l.], v. 69, n. 1, p. 53–57, 2003.

RUSSELL, R. W. R. TREATMENT OF LEPTOSPIROSIS WITH OXYTETRACYCLINE. **The Lancet**, [s. l.], v. 272, n. 7057, 1958.

RUSSELL, T. M.; DELOREY, M. J.; JOHNSON, B. J. B. Borrelia burgdorferiBbHtrA degrades host ECM proteins and stimulates release of inflammatory cytokines in vitro. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 90, p. 241–251, 2013.

RUSSELL, T. M.; JOHNSON, B. J. B. Lyme disease spirochaetes possess an aggrecan-binding protease with aggrecanase activity. **Molecular Microbiology**, [s. l.], p. 228–40, 2013.

SANHUEZA, J. M.; HEUER, C.; WEST, D. Contribution of Leptospira, Neospora caninum and bovine viral diarrhea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 112, n. 1–2, p. 90–98, 2013.

SANTOS, J. V.; PEREIRA, P. R. M.; FERNANDES, L. G. V.; SIQUEIRA, G. H.; DE SOUZA, G. O.; SOUZA FILHO, A.; VASCONCELLOS, S. A.; HEINEMANN, M. B.; CHAPOLA, E. G. B.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Binding of human plasminogen by the lipoprotein LipL46 of *Leptospira interrogans*. **Molecular and Cellular Probes**, [s. l.], v. 37, p. 12–21, 2018.

SATO, H.; COBURN, J. *Leptospira interrogans* causes quantitative and morphological disturbances in adherens junctions and other biological groups of proteins in human endothelial cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. e0005830, 2017.

SCHMIDT, T. P.; PERNA, A. M.; FUGMANN, T.; BÖHM, M.; JAN HISS; HALLER, S.; GÖTZ, C.; TEGTMEYER, N.; HOY, B.; RAU, T. T.; NERI, D.; BACKERT, S.; SCHNEIDER, G.; WESSLER, S. Identification of E-cadherin signature motifs functioning as cleavage sites for Helicobacter pylori HtrA. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 23264, 2016.

SEENICHAMY, A.; BAHAMAN, A. R.; MUTALIB, A. R.; KHAIRANI-BEJO, S. Production and Characterization of a Polyclonal Antibody of Anti-rLipL21-IgG against *Leptospira* for Early Detection of Acute Leptospirosis. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2014, 2014.

SETTE, A.; RAPPUOLI, R. Reverse Vaccinology: Developing Vaccines in the Era of Genomics. **Immunity**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 530–41, 2010.

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. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 64, n. 6, p. 2322–2330, 1996.

SHIJUN LI; OJCIUS, D. M.; SUMEI LIAO; LIWEI LI; FENG XUE; HAIYAN DONG; JIE YAN. Replication or death: distinct fates of pathogenic Leptospira strain Lai within macrophages of human or mouse origin. **Innate Immunity**, [s. l.], v. 16, n. 2, 2010.

SILVEIRA, M. M.; OLIVEIRA, T. L.; SCHUCH, R. A.; MCBRIDE, A. J. A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HARTWIG, D. D. DNA vaccines against leptospirosis: A literature review. **Vaccine**, [s. l.], v. 35, n. 42, 2017.

SIQUEIRA, G. H.; ATZINGEN, M. V.; DE SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. *Leptospira interrogans* Lsa23 protein recruits plasminogen, factor H and C4BP from normal human serum and mediates C3b and C4b degradation. **Microbiology**, [s. l.], v. 162, n. 2, p. 295–308, 2016.

SIQUEIRA, G. H.; TEIXEIRA, A. F.; FERNANDES, L. G.; DE SOUZA, G. O.; KIRCHGATTER, K.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. T. O. The recombinant LIC10508 is a plasma fibronectin, plasminogen, fibrinogen and C4BP- binding protein of *Leptospira interrogans*. **Pathogens and Disease**, [s. l.], p. ftv118, 2015.

SIQUEIRA, G. H.; VASCONCELLOS, S. A.; ALVES, I. J.; DE MORAIS, Z. M.; ATZINGEN, M. V.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Characterization of Three Novel Adhesins of *Leptospira interrogans*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 89, n. 6, p. 1103–16, 2013.

SKORKO-GLONEK, J.; ZURAWA-JANICKA, D.; KOPER, T.; JARZAB, M.; FIGAJ, D.; GLAZA, P.; LIPINSKA, B. HtrA Protease Family as Therapeutic Targets. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 977–1009, 2012.

SOUZA, N. M.; VIEIRA, M. L.; ALVES, I. J.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 53, n. 3–4, p. 125–34, 2012.

STERLING, C. R.; THIERMANN, A. B. Urban Rats as Chronic Carriers of Leptospirosis: An Ultrastructural Investigation. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 628–37, 1981.

STEVENSON, B.; CHOY, H. A.; PINNE, M.; ROTONDI, M. L.; MILLER, M. C.; DEMOLL, E.; KRAICZY, P.; COOLEY, A. E.; CREAMER, T. P.; SUCHARD, M. A.; BRISSETTE, C. A.; VERMA, A.; HAAKE, D. A. *Leptospira interrogans* Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 2, n. 11, p. e1188, 2007.

STUDIER, F. W.; ROSENBERG, A. H.; DUNN, J. J.; DUBENDORFF, J. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. In: [s.l: s.n.].

TEGTMEYER, N.; WESSLER, S.; NECCHI, V.; ROHDE, M.; HARRER, A.; RAU, T. T.; ASCHE, C. I.; BOEHM, M.; LOESSNER, H.; FIGUEIREDO, C.; NAUMANN, M.; PALMISANO, R.; SOLCIA, E.; RICCI, V.; BACKERT, S. Helicobacter pylori Employs a Unique Basolateral Type IV Secretion Mechanism for CagA Delivery. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 22, p. 552–560, 2017.

TEIXEIRA, A. F.; CAVENAGUE, M. F.; KOCHI, L. T.; FERNANDES, L. G.; SOUZA, G. O.; DE SOUZA FILHO, A. F.; VASCONCELLOS, S. A.; HEINEMANN, M. B.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Immunoprotective Activity Induced by Leptospiral Outer Membrane Proteins in Hamster Model of Acute Leptospirosis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, 2020.

TEIXEIRA, A. F.; DE MORAIS, Z. M.; KIRCHGATTER, K.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Features of Two New Proteins

with OmpA-Like Domains Identified in the Genome Sequences of *Leptospira interrogans*. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. e0122762, 2015.

TIMPL, R.; ROHDE, H.; ROBEY, P. G.; RENNARD, S. I.; FOIDART, J. M.; MARTIN, G. R. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. **J Biol Chem**, [s. l.], v. 254, n. 19, p. 9933–9937, 1979.

TO, W. S.; MIDWOOD, K. S. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2011.

TOMA, C.; MURRAY, G. L.; NOHARA, T.; MIZUYAMA, M.; KOIZUMI, N.; ADLER, B.; SUZUKI, T. Leptospiral outer membrane protein LMB216 is involved in enhancement of phagocytic uptake by macrophages. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 1366–77, 2014.

TOMA, C.; OKURA, N.; TAKAYAMA, C.; SUZUKI, T. Characteristic features of intracellular pathogenic Leptospira in infected murine macrophages. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. 11, 2011.

TREVEJO, R. T.; RIGAU-PÉREZ, J. G.; ASHFORD, D. A.; MCCLURE, E. M.; JARQUÍN-GONZÁLEZ, C.; AMADOR, J. J.; DE LOS REYES, J. O.; GONZALEZ, A.; ZAKI, S. R.; SHIEH, W.; MCLEAN, R. G.; NASCI, R. S.; WEYANT, R. S.; BOLIN, C. A.; BRAGG, S. L.; PERKINS, B. A.; SPIEGEL, R. A. Epidemic Leptospirosis Associated with Pulmonary Hemorrhage—Nicaragua, 1995. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 178, n. 5, 1998.

TSUCHIMOTO, M.; NIIKURA, M.; ONO, E.; KIDA, H.; YANAGAWA, R. Leptospiral attachment to cultured cells. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology**, [s. l.], v. 258, n. 2–3, p. 268–74, 1984.

TURNER, L. H. Leptospirosis. 3. Maintenance, isolation and demonstration of leptospires. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 64, n. 4, 1970.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S. G. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 40, n. 15, p. e115, 2012.

VALIDI, M.; KARKHAH, A.; PRAJAPATI, V. K.; NOURI, H. R. Immuno-informatics based approaches to design a novel multi epitope-based vaccine for immune response reinforcement against Leptospirosis. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 104, p. 128–138, 2018.

VAN STOKKUM, I. H. M.; SPOELDER, H. J. W.; BLOEMENDAL, M.; VAN GRONDELLE, R.; GROEN, F. C. A. Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 191, n. 1, 1990.

VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **BioTechniques**, [s. l.], v. 44, n. 5, 2008.

VERMA, A.; HELLWAGE, J.; ARTIUSHIN, S.; ZIPFEL, P. F.; KRAICZY, P.; TIMONEY, J. F.; STEVENSON, B. LfhA, a Novel Factor H-Binding Protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 74, n. 5, p. 2659–66, 2006.

VIEIRA, M. L.; ATZINGEN, M. V.; OLIVEIRA, T. R.; OLIVEIRA, R.; ANDRADE, D. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. In Vitro Identification of Novel Plasminogen-Binding Receptors of the Pathogen *Leptospira interrogans*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. e11259, 2010. a.

VIEIRA, M. L.; DE MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. **Journal of Infection**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 52–64, 2010. b.

VIEIRA, M. L.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. T. O. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic Leptospira interrogans. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 51, n. 5, 2011.

VIEIRA, M. L.; FERNANDES, L. G.; DOMINGOS, R. F.; OLIVEIRA, R.; SIQUEIRA, G. H.; SOUZA, N. M.; TEIXEIRA, A. R. F.; ATZINGEN, M. V.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 352, n. 2, p. 129–39, 2014.

VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Interaction of spirochetes with the host fibrinolytic system and potential roles in pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 573–87, 2016.

VIEIRA, M. L.; VASCONCELLOS, S. A.; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Plasminogen Acquisition and Activation at the Surface of *Leptospira* Species Lead to Fibronectin Degradation. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 77, n. 9, 2009.

VINCENT, A. T.; SCHIETTEKATTE, O.; GOARANT, C.; NEELA, V. K.; BERNET, E.; THIBEAUX, R.; ISMAIL, N.; MOHD KHALID, M. K. N.; AMRAN, F.; MASUZAWA, T.; NAKAO, R.; AMARA KORBA, A.; BOURHY, P.; VEYRIER, F. J.; PICARDEAU, M. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. e0007270, 2019.

VINH, T.; FAINE, S.; ADLER, B. Adhesion of leptospires to mouse fibroblasts (L929) and its enhancement by specific antibody. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 73–85, 1984.

WALLER, P. R. H.; SAUER, R. T. Characterization of degQ and degS, Escherichia coli genes encoding homologs of the DegP protease. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 178, p. 1146–1153, 1996.

WEISEL, J. W. Fibrinogen and Fibrin. In: [s.l: s.n.].

WERTS, C.; TAPPING, R. I.; MATHISON, J. C.; CHUANG, T.-H.; KRAVCHENKO, V.; SAINT GIRONS, I.; HAAKE, D. A.; GODOWSKI, P. J.; HAYASHI, F.; OZINSKY, A.;

UNDERHILL, D. M.; KIRSCHNING, C. J.; WAGNER, H.; ADEREM, A.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 2, n. 4, 2001.

WIEDEMANN, C.; BELLSTEDT, P.; GÖRLACH, M. CAPITO—a web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 29, n. 14, 2013.

WU, B.; BAO, L.; SUN, Z.; LI, D.; ZHANG, Y. [The OmpA-like protein Loa22 from Leptospira interrogans serovar lai induces apoptosis in A549 via Ca2+ signal pathway]. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 298–302, 2011.

XU, G.; PAN, M.; LIN, G.; YAN, Y.; WANG, L. L. P. Observation on the immune efficiency after vaccination with new pentavalent whole cell vaccine for leptospirosis in Fujian province. **Chin J Zoonose**, [s. l.], v. 21, p. 73–78, 2005.

XU, Y.; YE, Q. Human leptospirosis vaccines in China. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 984–993, 2017.

XU, Y.; YUEN, P.-W.; LAM, J. Intranasal DNA Vaccine for Protection against Respiratory Infectious Diseases: The Delivery Perspectives. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 6, n. 3, 2014.

YAN, W.; FAISAL, S. M.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, C.-F.; PAN, M.-J.; AKEY, B.; CHANG, Y.-F. Identification and characterization of OmpA-like proteins as novel vaccine candidates for Leptospirosis. **Vaccine**, [s. l.], v. 28, n. 11, 2010.

YAN, W.; FAISAL, S. M.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; BARR, S. C.; CHANG, C.-F.; PAN, M.-J.; CHANG, Y.-F. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant Leptospira immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 11, n. 2, 2009.

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

ZARZECKA, U.; MATKOWSKA, D.; BACKERT, S.; SKORKO-GLONEK, J. Importance of two <scp>PDZ</scp> domains for the proteolytic and chaperone activities of *Helicobacter pylori* serine protease <scp>HtrA</scp>. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. e13299, 2021.

ZHANG, L.; ZHANG, C.; OJCIUS, D. M.; SUN, D.; ZHAO, J.; LIN, X.; LI, L.; LI, L.; YAN, J. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic Leptospira species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 83, n. 5, p. 1006–23, 2012.

ZHANG, X.; YANG, X.; KUMAR, M.; PAL, U. BB0323 Function Is Essential for *Borrelia burgdorferi* Virulence and Persistence through Tick-Rodent Transmission Cycle. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 200, n. 8, p. 1318–1330, 2009.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 9, p. 40, 2008.

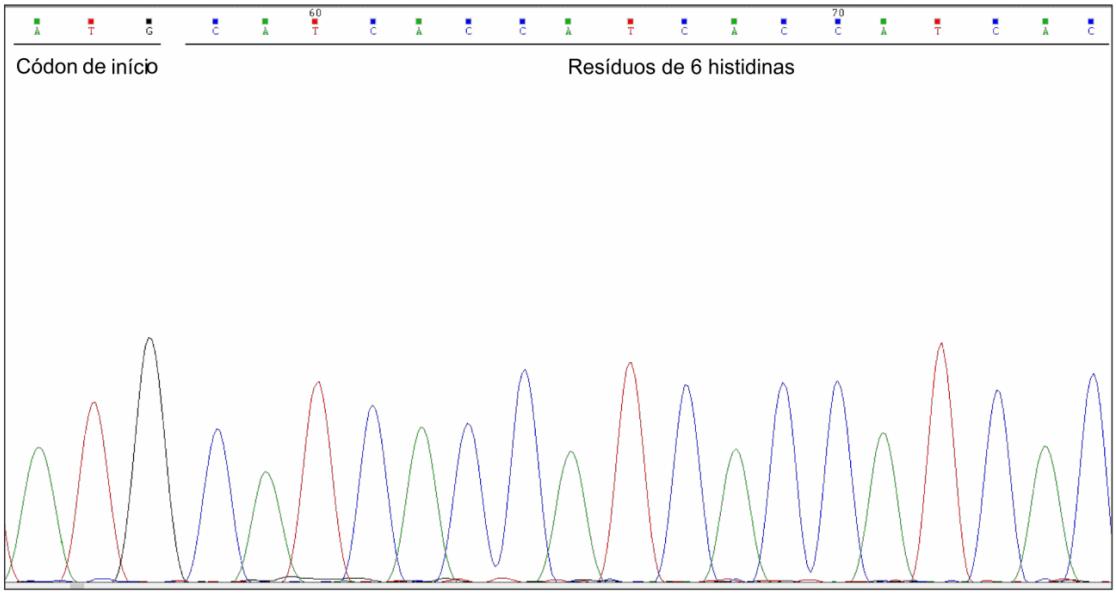
ZHUKOVA, A.; FERNANDES, L. G.; HUGON, P.; PAPPAS, C. J.; SISMEIRO, O.; COPPÉE, J.-Y.; BECAVIN, C.; MALABAT, C.; ESHGHI, A.; ZHANG, J.-J.; YANG, F. X.; PICARDEAU, M. Genome-Wide Transcriptional Start Site Mapping and sRNA Identification in the Pathogen Leptospira interrogans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 7, 2017.

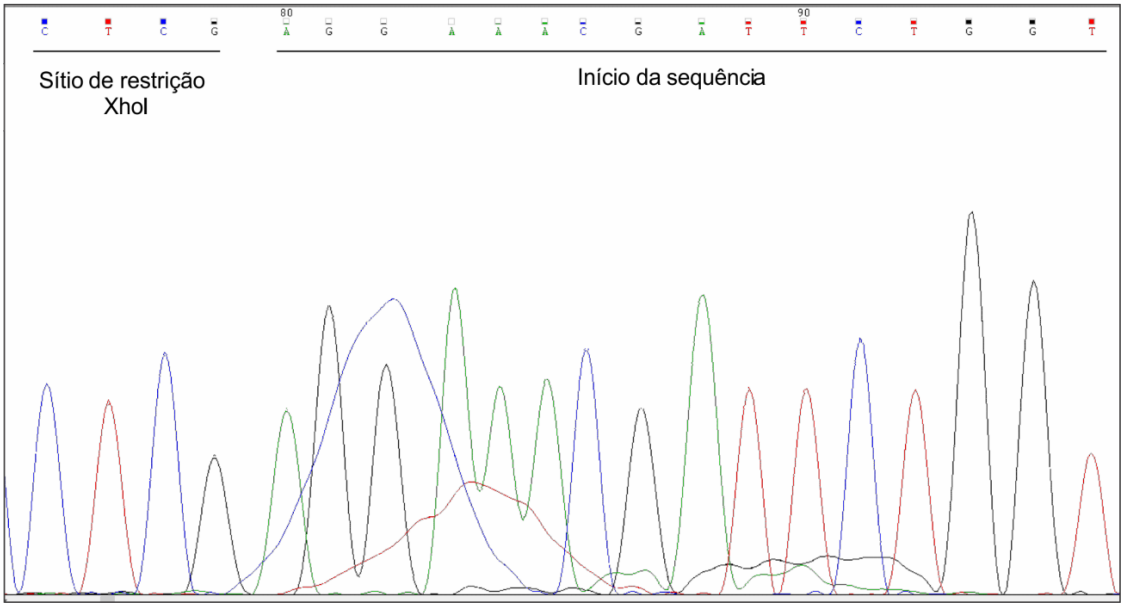
ZUERNER, R. L. Host Response to Leptospira Infection. In: [s.l: s.n.].

APÊNDICES

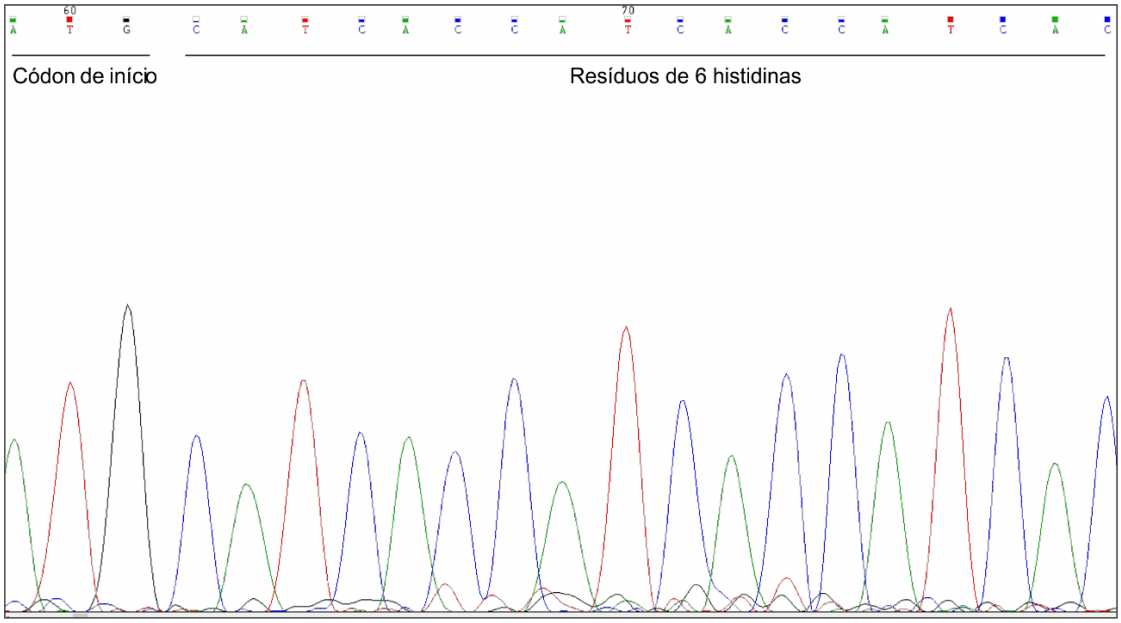
Apêndice A – Cromatogramas do início dos sequenciamentos das construções dos genes no vetor pAE

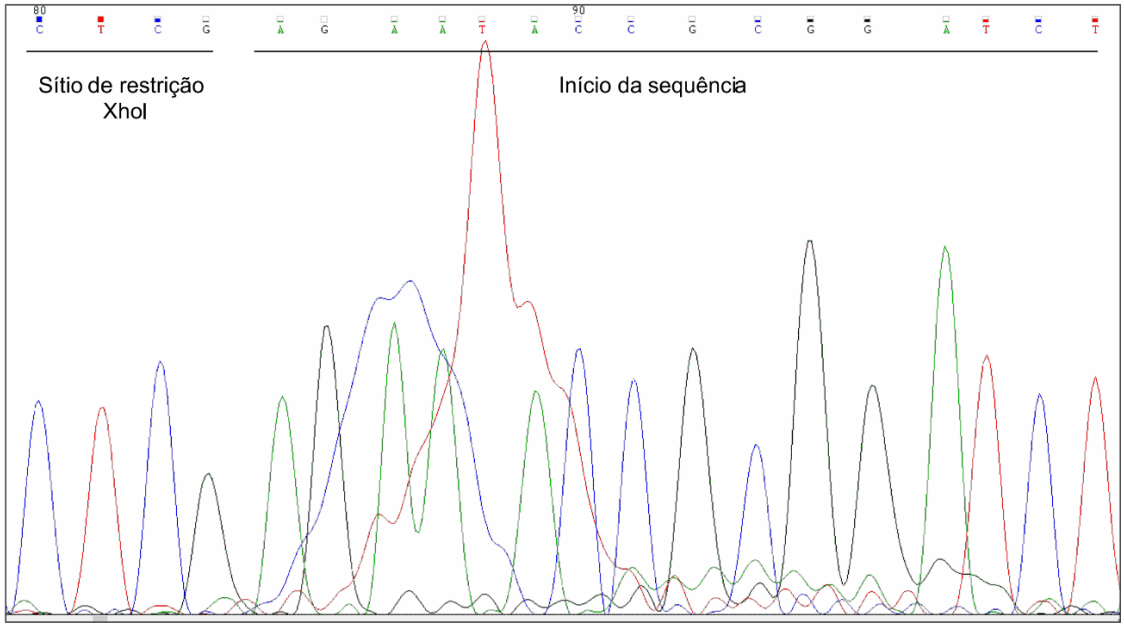
LIC11111-pAE





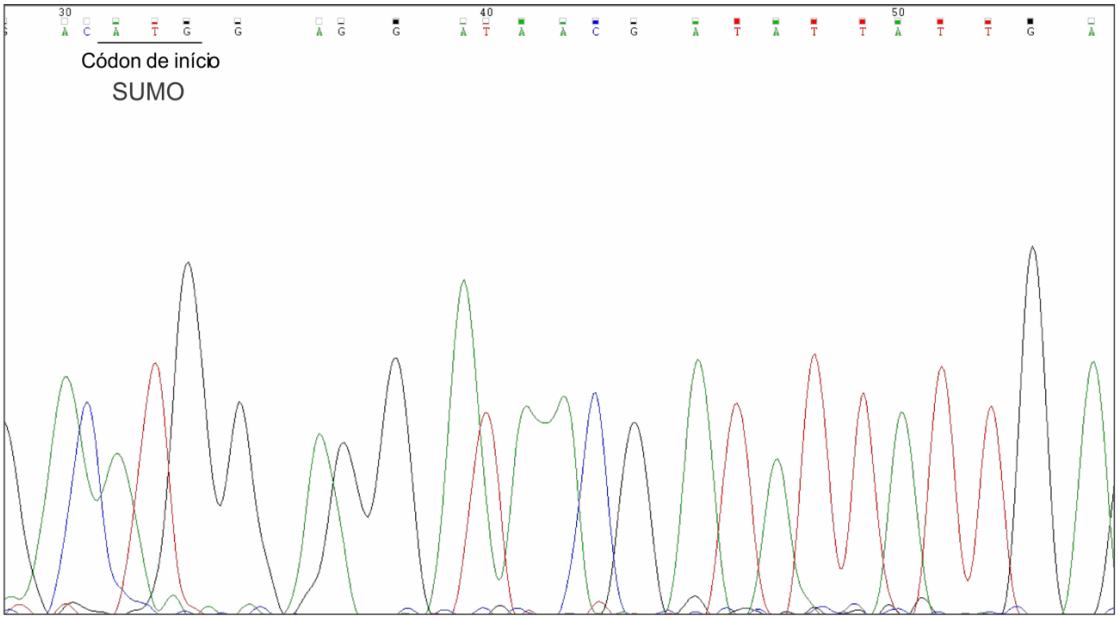
LIC11112-pAE

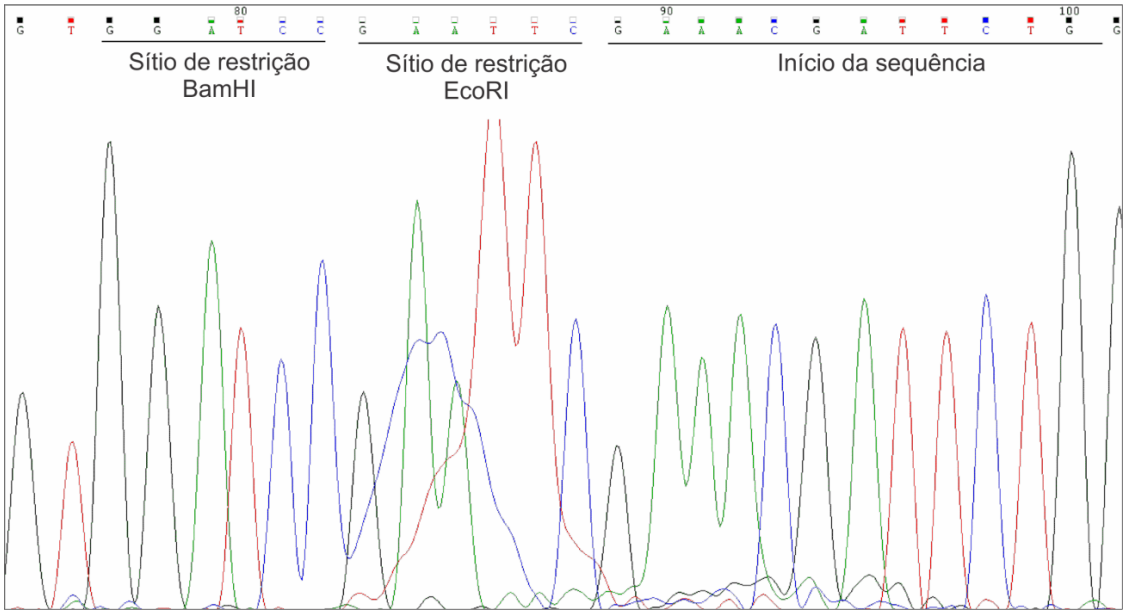




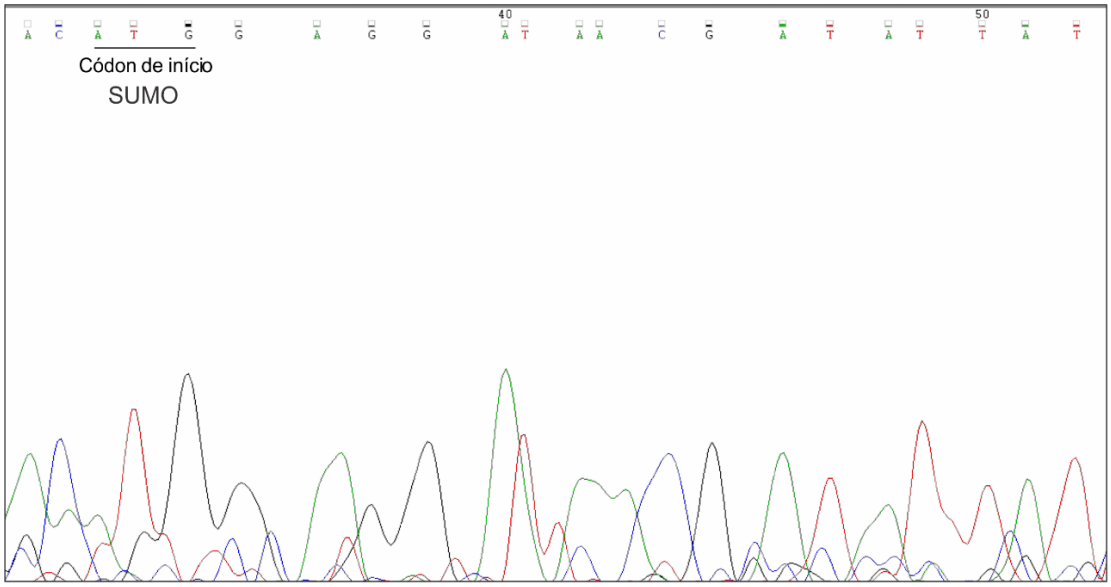
Apêndice B – Cromatogramas do início dos sequenciamentos das construções dos genes no vetor pET-SUMO

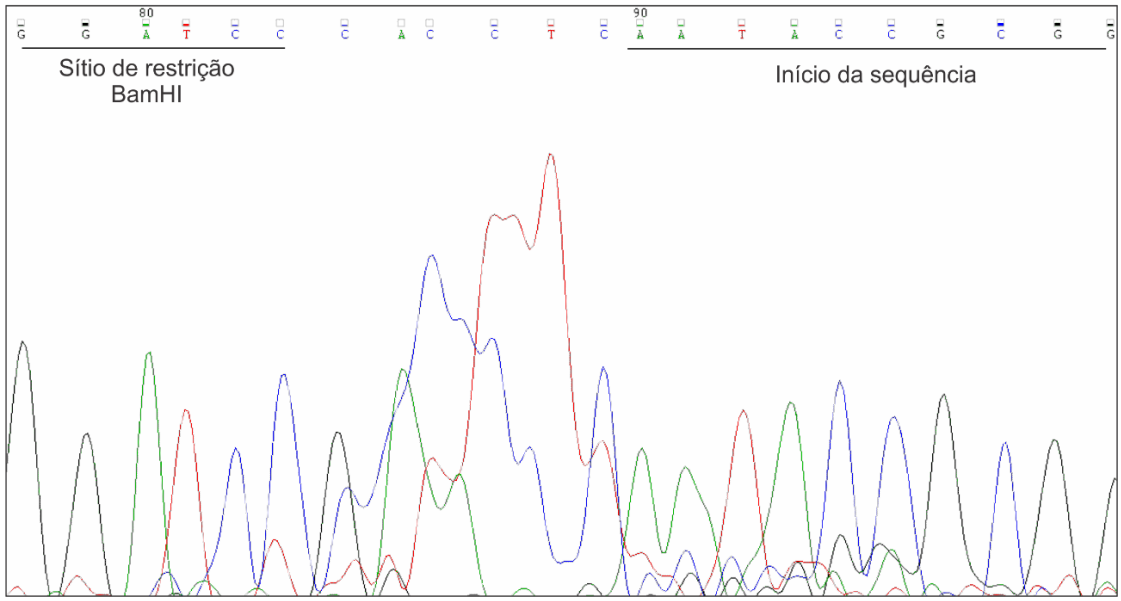
LIC11111-pET-SUMO





LIC11112-pET-SUMO





ANEXO

1 – Produção científica obtida durante o período do Doutorado Direto

Artigos publicados

DAROZ, B. B.; FERNANDES, L. G. V.; TEIXEIRA, A. F.; NASCIMENTO, A. L. T. O. In Silico Structural and Functional Characterization of HtrA Proteins of Leptospira spp.: Possible Implications in Pathogenesis. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 5, n. 4, 2020.

NASCIMENTO FILHO, E. G., VIEIRA, M. L., TEIXEIRA, A. F., SANTOS, J. C., FERNANDES, L., PASSALIA, F. J., **DAROZ, B. B**., ROSSINI, A., KOCHI, L. T., CAVENAGUE, M. F., PIMENTA, D. C., NASCIMENTO, A. L. T. O. Proteomics as a tool to understand Leptospira physiology and virulence: Recent advances, challenges and clinical implications. **Journal of proteomics**, v. 180, p. 80–87, 2018.

TEIXEIRA, A. F., FERNANDES, L., CAVENAGUE, M. F., TAKAHASHI, M. B., SANTOS, J. C., PASSALIA, F. J., **DAROZ, B. B**., KOCHI, L. T., VIEIRA, M. L., Nascimento, A. L. T. O. Adjuvanted leptospiral vaccines: Challenges and future development of new leptospirosis vaccines. **Vaccine**, v. 37(30), p. 3961–3973, 2019.

Artigo submetido

DAROZ, B. B.; FERNANDES, L. G. V.; CAVENAGUE, M. F.; KOCHI, L. T.; PASSALIA, F. J.; TAKAHASHI, M. B.; NASCIMENTO FILHO, E. G.; TEIXEIRA, A. F.; NASCIMENTO, A. L. T.O. A review on host-Leptospira interactions: what we know and future expectations. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.**

Tropical Medicine and Infectious Disease

MDPI

Article

In Silico Structural and Functional Characterization of HtrA Proteins of *Leptospira* spp.: Possible Implications in Pathogenesis

Brenda Bevilaqua Daroz [1,2], Luis Guilherme Virgílio Fernandes [1], Aline Florencio Teixeira [1] and Ana Lucia Tabet Oller Nascimento [1,2,*]

[1] Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto Butantan, São Paulo 05503-000, Brazil; brenda.daroz@butantan.gov.br (B.B.D.); luis.fernandes@butantan.gov.br (L.G.V.F.); aline.teixeira@butantan.gov.br (A.F.T.)

[2] Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo 05508-900, Brazil

* Correspondence: ana.nascimento@butantan.gov.br

Received: 14 October 2020; Accepted: 23 November 2020; Published: 28 November 2020

check for updates

Abstract: Leptospirosis is a zoonosis caused by the pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*. The identification of conserved outer membrane proteins among pathogenic strains is a major research target in elucidating mechanisms of pathogenicity. Surface-exposed proteins are most probably the ones involved in the interaction of leptospires with the environment. Some spirochetes use outer membrane proteases as a way to penetrate host tissues. HtrA is a family of proteins found in various cell types, from prokaryotes to primates. They are a set of proteases usually composed of a serine protease and PDZ domains, and they are generally transported to the periplasm. Here, we identified four genes—annotated as HtrA, LIC11111, LIC20143, LIC20144 and LIC11037—and another one annotated as a serine protease, LIC11112. It is believed that the last forms a functional heterodimer with LIC11111, since they are organized in one operon. Our analyses showed that these proteins are highly conserved among pathogenic strains. LIC11112, LIC20143, and LIC11037 have the serine protease domain with the conserved catalytic triad His-Asp-Ser. This is the first bioinformatics analysis of HtrA proteins from *Leptospira* that suggests their proteolytic activity potential. Experimental studies are warranted to elucidate this possibility.

Keywords: *Leptospira*; leptospirosis; HtrA protein; pathogenesis

1. Introduction

Leptospirosis is an important zoonosis caused by the pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*, affecting humans and animals worldwide. The disease is responsible for causing more than 1 million infections with 60,000 deaths per year [1]. Human infection occurs mainly through direct contact with the urine or other biological fluids of infected animals or via indirect contact with contaminated soil or water [2,3]. After contact with damaged skin or mucosa, leptospires can rapidly penetrate and overcome host biological barriers, reaching target organs within 1 hour of infection [4], showing high invasive potential.

The disease displays several clinical manifestations, ranging from asymptomatic, mild, and benign, to more severe forms. The initial phase is characterized by fever, chills, headache and muscle pain, and it can progress to a more severe condition, known as Weil's syndrome. This condition is characterized by hemorrhage, renal failure, and jaundice. Often, the initial symptoms can be confused with other diseases, such as influenza and dengue, making it difficult to diagnose and possibly leading to the patient's death [5].

Vaccine 37 (2019) 3961–3973

Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Review

Adjuvanted leptospiral vaccines: Challenges and future development of new leptospirosis vaccines

Aline F. Teixeira [a], Luis G.V. Fernandes [a], Maria F. Cavenague [a,b], Maria B. Takahashi [a,b], Jademilson C. Santos [a], Felipe J. Passalia [a,b], Brenda B. Daroz [a,b], Leandro T. Kochi [a,b], Monica L. Vieira [a], Ana L.T.O. Nascimento [a,*]

[a] Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vacinas – Centro de Biotecnologia – Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil
[b] Programa de Pos-Graduação Interunidades em Biotecniologia, Instituto de Ciencias Biomedicas, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 February 2019
Received in revised form 16 April 2019
Accepted 21 May 2019
Available online 8 June 2019

Keywords:
Leptospira
Leptospirosis
Vaccine
Adjuvant

ABSTRACT

Leptospirosis is a neglected infectious disease of global importance. Vaccination is the most viable strategy for the control of leptospirosis, but in spite of efforts for the development of an effective vaccine against the disease, few advances have been made, and to date, bacterin is the only option for prevention of leptospirosis. Bacterins are formulations based on inactivated leptospires that present a series of drawbacks, such as serovar-dependence and short-term immunity. Therefore, bacterins are not widely used in humans, and only Cuba, France and China have these vaccines licensed for at-risk populations. The development of recombinant DNA technology emerges as an alternative to solve the problem. Recombinant protein-based vaccines or DNA vaccines seem to be an attractive strategy, but the use of adjuvants is critical for achievement of a protective immune response. Adjuvants are capable of enhancing and/or modulating immune responses by exposing antigens to antigen-presenting cells. In the last years, several components have been tested as adjuvants, such as aluminum salts, oil based-emulsion adjuvants, bacteria-derived components and liposomes. This review highlights the use of adjuvants in the multiple vaccine approaches that have been used for leptospirosis and their most important immunological aspects. Immune response data generated by these strategies can contribute to the understanding of the immune mechanisms involved in protection against leptospirosis, and consequently, the development of effective vaccines against this disease. This is the first review on leptospiral vaccines focusing on adjuvant aspects.

© 2019 Published by Elsevier Ltd.

Contents

1. Introduction . . . 3962
2. Aluminum salt-based adjuvants . . . 3962
3. Emulsion-based adjuvants . . . 3965
4. Vaccines formulated with bacteria-derived adjuvants . . . 3965
5. Liposome adjuvants . . . 3968
6. Other adjuvants . . . 3969
7. Conclusion . . . 3969
8. Declarations . . . 3970
9. Fundings . . . 3970
10. Authors' contributions . . . 3970
Declaration of Competing Interest . . . 3970
Acknowledgement . . . 3970
References . . . 3970

* Corresponding author.
E-mail address: ana.nascimento@butantan.gov.br (A.L.T.O. Nascimento).

https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.087
0264-410X/© 2019 Published by Elsevier Ltd.

Journal of Proteomics 180 (2018) 80–87

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot

Proteomics as a tool to understand *Leptospira* physiology and virulence: Recent advances, challenges and clinical implications

Edson G. Nascimento Filho[a], Monica L. Vieira[a], Aline F. Teixeira[a], Jademilson C. Santos[a], Luis G.V. Fernandes[a], Felipe J. Passalia[a,b], Brenda B. Daroz[a,b], Amanda Rossini[a,b], Leandro T. Kochi[a,b], Maria F. Cavenague[a,b], Daniel C. Pimenta[c], Ana L.T.O. Nascimento[a,*]

[a] *Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900 Sao Paulo, SP, Brazil*
[b] *Programa de Pos-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil*
[c] *Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900 Sao Paulo, SP, Brazil*

ARTICLE INFO

Keywords:
Leptospira
Leptospirosis, infectious diseases
Proteomics

ABSTRACT

Leptospirosis is a severe disease that represents a significant burden to healthcare costs in the absence of prophylactic measures. There is no effective vaccine for humans. Although *Leptospira* genome sequencing has broadened our current knowledge of the life cycle and evolution of these bacteria, there is still much to be understood regarding the pathophysiological features of this organism. In tropical, underdeveloped regions, it is the predominant human disease. Pathogenic bacteria of the genus *Leptospira* are the etiological agents of leptospirosis. This review addresses the contributions made to our knowledge of leptospirosis based on proteomic strategies. We present here the advances made on several fronts in understanding the infectious agent *Leptospira*, from the initial 2D-gel electrophoresis proteomics approach to more advanced mass spectrometry (MS) technologies. This review provides an update on proteomic studies of *Leptospira* spp. and should be constructive in further investigations of these bacteria, in our fight against leptospirosis.

Impact of our work: Leptospirosis is a severe disease that represents a significant burden to healthcare costs in the absence of prophylactic measures. There is no efficient vaccine for humans. This review addresses the contribution to *Leptospira* knowledge based on proteomic strategies. From the initial 2D- gel electrophoreses proteomics approach to more sophisticated mass spectrometry (MS) technologies, we have compiled most recent data of authors that have performed proteomic analyses on various approaches of leptospirosis, for instance: (i) authors that have assessed the infected rat urine, searching for markers; (ii) authors that have compared the proteome profiles of bacteria grown *in vivo* × *in vitro*; (iii) authors that have searched for vaccine candidates.

This is a critical review on this subject pointing out future directions on *Leptospira*/leptospirosis research proteomics field, envisaging rational future work to increase our knowledge of these bacteria and help fight leptospirosis.

1. Introduction

Leptospirosis is a zoonosis of global importance, which in recent years has been considered one of the leading emerging infectious diseases [1]. It is caused by a group of bacteria belonging to the order Spirochetales, family Leptospiracea. The genus *Leptospira* consists of pathogenic and intermediate species, which cause severe and mild leptospirosis, respectively, and non-pathogenic saprophytic species. There are > 250 serovars identified in 24 different serogroups [2]. The Copenhageni and Icterohaemorrhagie are the most pathogenic and prevalent serovars in humans in urban centers [3,4]. The incidence of human infections is mainly in tropical and subtropical countries, where conditions for transmission are favorable [3]. Infection occurs mainly through exposure to soil or water contaminated with urine from infected mammals.

In humans, the symptoms associated with the disease range from a subclinical infection characterized by fever, chills, headaches, and myalgia to more severe forms, such as Weil's syndrome and severe pulmonary hemorrhagic syndrome [1]. The severe manifestations of leptospirosis reach about 10 to 50% mortality in adults aged 30–40 years [5]. According to the international agencies WHO (World Health Organization) and GBD (Global Burden of Disease) [4], it has been estimated that there are 1 million clinical cases of leptospirosis annually, with death rates reaching about 60,000 individuals

* Corresponding author.
E-mail address: ana.nascimento@butantan.gov.br (A.L.T.O. Nascimento).

https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.025
Received 31 October 2017; Received in revised form 14 February 2018; Accepted 22 February 2018
Available online 01 March 2018
1874-3919/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.