

RENATA DE SIQUEIRA MENDES

**“Caracterização de proteínas de membrana de  
*Leptospira interrogans* expressas em  
*Escherichia coli*”**

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

São Paulo  
2011

RENATA DE SIQUEIRA MENDES

**“Caracterização de proteínas de membrana de  
*Leptospira interrogans* expressas em  
*Escherichia coli*”**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento

Co-orientadora: Dra. Marina Von Atzingen dos Reis

Versão original

São Paulo  
2011

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

© reprodução total

Mendes, Renata de Siqueira.

Caracterização de proteínas de membrana de *Leptospira interrogans* expressas em *Escherichia coli* / Renata de Siqueira Mendes. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento.

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

Versão do título para o inglês: Characterization of membrane proteins of *Leptospira interrogans* expressed in *Escherichia coli*.

Descritores: 1. Leptospirose 2. Proteínas recombinantes 3. Vacinas 4. Genomas 5. *Leptospira interrogans* 6. *Spirochaetales* I. Nascimento, Ana Lucia Tabet Oller do II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0124/2011

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

---

Candidato(a): Renata de Siqueira Mendes.

Título da Dissertação: Caracterização de proteínas de membrana de *Leptospira interrogans* expressas em *Escherichia coli*.

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

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

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

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

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

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



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

## CERTIFICADO

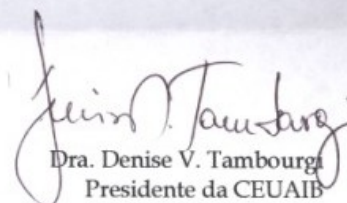
Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização de proteínas de membrana de *L. interrogans* expressas em *E. coli*" protocolo n° 600/09 sob a responsabilidade de Ana Lúcia T. O. do Nascimento e Renata de Siqueira Mendes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/05/2009.

We certify that the research entitled "Characterization of membrane proteins of *L. interrogans* expressed in *E. coli*", protocol n°600/09, under the responsibility of Ana Lúcia T. O. do Nascimento and Renata de Siqueira Mendes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 05/13/2009.

A vigência do projeto foi alterada, atendendo a solicitação da pesquisadora responsável em 03/2010

Vigência do Projeto:	N° de animais/espécie
05/2009 – 07/2011	51 camundongos Balb/c – Fêmeas
Centro de Biotecnologia	18 hamsters Golden - Fêmeas

São Paulo, 17 de março de 2010.

  
Dra. Denise V. Tambourg  
Presidente da CEUAIB

De acordo:

  
Dr. Otávio Azevedo Mercadante  
Diretor do Instituto Butantan

*Aos meus pais, Cloves e Irinéia.*

*Obrigada por tudo...*

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento pela orientação e por me receber em seu laboratório, confiar e incentivar durante a realização do Mestrado.

À minha co-orientadora Dra. Marina Von Atzingen dos Reis, pelo incentivo, pela ajuda e orientação, e também aos outros colegas do Laboratório de Biotecnologia Molecular II – Centro de Biotecnologia, do Instituto Butantan: Rosane, Mônica, Renan, Gabriela, Tatiane, Gustavo, Daniel, Aline, Luís, Caio, Natalie, Ivy e Ana Helena, pela convivência, cooperação, compartilhamento de idéias e, não menos importante, pelos momentos de descontração.

Ao professor Dr. Sílvio A. Vasconcellos, Ms. Amane P. Gonçalves, Zenáide M. de Moraes e Gisele do Laboratório de Zoonose da Faculdade de Medicina Veterinária da USP pela colaboração com as culturas de leptospiras e ensaios de imunoproteção em hamster.

À professora Dra. Eliete C. Romero do Instituto Adolfo Lutz pela colaboração com os soros de pacientes.

À professora Dra. Toshie Kawano (em memória) e Alexander S. Souza do Departamento de Parasitologia, Instituto Butantan, pelo auxílio no microscópio confocal.

Aos meus pais Cloves e Irinéia pelo apoio e incentivo durante todo esse período e por toda a minha formação, que foram imprescindíveis para que mais essa etapa fosse possível.

Aos meus familiares e amigos, e ao meu noivo Alfredo, por sempre me apoiar, compreender e pela paciência.

À coordenação do curso de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo / Instituto Butantan / Instituto de Pesquisas Tecnológicas, e a todos os professores que contribuíram para a minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado e financiamento do projeto, bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Butantan.

Obrigada!

*“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein



## RESUMO

MENDES, R. S. **Caracterização de proteínas de membrana de *Leptospira interrogans* expressas em *Escherichia coli***. 2011. 131 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Leptospirose é uma zoonose altamente disseminada causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. Os roedores são os principais reservatórios da doença nos centros urbanos. Anualmente, são relatados no Brasil cerca de 5.000 casos, os quais ocorrem como surtos epidêmicos nas épocas de chuva. O sequenciamento genômico da *L. interrogans* sorovar Copenhageni e os avanços das análises bioinformáticas permitiram a identificação de novos candidatos vacinais e novos fatores de virulência. Dessa forma, foram selecionados através de bioinformática seis genes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, LIC10411, LIC12891, LIC10827, LIC13305, LIC11469 e LIC11030, os quais foram submetidos a ensaios de conservação do DNA genômico, RNA mensageiro e proteína nativa correspondente em onze sorovares patogênicos prevalentes no Brasil e um sorovar saprofítico de *Leptospira*. Através desses ensaios, observamos que o gene LIC11469 foi o mais conservado entre os sorovares testados. Os seis genes foram posteriormente clonados em vetor de expressão pAE, com adição de sequência codificadora de seis resíduos de histidina N-terminal, e submetidos a testes de expressão em diferentes linhagens de *E. coli*. Quatro desses genes não foram expressos em nenhuma linhagem testada, de forma que os estudos prosseguiram com os genes LIC11469 e LIC11030. Após a expressão, as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade a metal, e submetidas a ensaio de dicroísmo circular, que demonstrou que ambas as proteínas estavam estruturadas. Por meio de testes de imunogenicidade em camundongos, ambas as proteínas se mostraram altamente imunogênicas, apresentando altos títulos de anticorpos. Em seguida foram feitos ensaios de localização celular – imunofluorescência de fase líquida e proteólise com proteinase K – nos quais pudemos observar a presença das proteínas nativas correspondentes na membrana externa de *Leptospira*. Em ensaios de adesão a componentes de matriz extracelular e componentes do soro humano, a proteína rLIC11469 apresentou ligação à laminina e ao plasminogênio, de forma dose-dependente e saturável, e que o plasminogênio ligado à rLIC11469, na

presença do ativador específico, pode ser convertido em plasmina enzimaticamente ativa. Observou-se também que ambos os componentes, laminina e plasminogênio, parecem competir pelo sítio de ligação à rLIC11469. Adicionalmente, concentrações crescentes de rLIC11469 inibem a ligação de leptospiros vivas à esses componentes. Ensaio de imunização e desafio demonstraram que a proteína rLIC11030 conferiu proteção parcial contra infecção letal de *L. interrogans* em hamsters. Ensaio de reatividade com soros de pacientes diagnosticados com leptospirose mostraram que há reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos presentes nesses soros, sugerindo que essas proteínas são provavelmente expressas durante a infecção.

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

## ABSTRACT

MENDES, R. S. **Characterization of membrane proteins of *Leptospira interrogans* expressed in *Escherichia coli***. 2011. 131 p. Masters Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Leptospirosis is a widespread zoonosis caused by pathogenic species of the genus *Leptospira*. Rodents are the main reservoirs of the disease in the urban areas. Annually, around 5,000 cases are reported in Brazil, which occurs in endemic outbreaks during the rainy season. The genomic sequencing and the advances of bioinformatics analysis allowed the identification of new vaccine candidates and new virulence factors. Therefore, six genes from *L. interrogans* serovar Copenhageni: LIC10411, LIC12891, LIC10827, LIC13305, LIC11469 and LIC11030, were selected through bioinformatic tools and subjected to conservation assays employing genomic DNA, mRNA and native protein from eleven pathogenic serovars predominant in Brazil and one saprophytic serovar of *Leptospira*. Through these assays, the gene LIC11469 was revealed to be the most conserved among the tested serovars. The six genes were then cloned into pAE expression vector, with addition of 6xHis-tag at N-terminus, and subjected to expression tests in different strains of *E. coli*. Four of these genes could not be expressed in any strain assayed, and therefore studies were continued with the genes LIC11469 and LIC11030. After the protein expression, the recombinants were purified by metal affinity chromatography, and subjected to circular dichroism, that revealed well folded proteins. Through immunogenicity tests in mice, both proteins showed to be highly immunogenic, with high antibodies titers. Additionally, we performed cellular localization assays by liquid phase immunofluorescence assay and proteolysis with proteinase K: we could observe the presence of the corresponding native proteins on the outer membrane of *Leptospira*. By ELISA attachment assay to the extracellular matrix components (ECM) and human serum components, the protein rLIC11469 were shown to binding activity to laminin and plasminogen, in a dose-dependent and saturable manner. The plasminogen bound to rLIC11469 when in the presence of the specific activator was converted in enzymatically active plasmin. We have also demonstrated that both components, laminin and plasminogen, seems to compete for the binding site to rLIC11469. Additionally, increasing concentrations of rLIC11469 inhibits the binding

of live leptospires to these components. Our results with the immunization and challenge assays showed that the protein rLIC11030 afforded partial protection against lethal leptospiral challenge in hamsters. Reactivity assays with sera from human patients diagnosed with leptospirosis showed that the recombinant proteins could be recognized by their antibodies, suggesting that these proteins are probably expressed during infection.

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

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Análise filogenética do gene 16S do rRNA de 19 espécies representativas do gênero <i>Leptospira</i> .....	21
Figura 2 – Modelo da estrutura da membrana de <i>Leptospira</i> spp.....	23
Figura 3 – Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy.....	37
Figura 4 – Mapa do vetor de expressão pAE.....	38
Figura 5 – Análise da conservação genômica dos genes LIC10411, LIC12891, LIC13305, LIC11030, LIC11469 e LIC10827 em cepas de <i>Leptospira</i> .....	60
Figura 6 – Análise da expressão dos genes LIC11469 e LIC11030 em cepas de <i>Leptospira</i> através de <i>Immunoblotting</i> .....	62
Figura 7 – Análise da expressão dos genes LIC11469 e LIC11030 em cepas de <i>Leptospira</i> através de eletroforese em gel de agarose 1%.....	62
Figura 8 – DNA de interesse amplificado através de reação de PCR.....	63
Figura 9 – Insetos de DNA obtidos por digestão do DNA plasmidial (pGEM/inserção).....	64
Figura 10 – Insetos de DNA obtidos por digestão do DNA plasmidial (pAE/inserção).....	65
Figura 11 – Análise da expressão das proteínas recombinantes através de PAGE/SDS.....	67
Figura 12 – Análise da expressão das proteínas recombinantes através de PAGE/SDS.....	68
Figura 13 – Ensaio de <i>Immunoblotting</i> utilizando anticorpo anti-polihistidina.....	69
Figura 14 – Análise da purificação da proteína recombinante rLIC11030, de ~36.5 kDa.....	70
Figura 15 – Análise da purificação da proteína recombinante rLIC11469, de ~20 kDa.....	71
Figura 16 – Quantificação das proteínas recombinantes através de curva de BSA.....	72
Figura 17 – Espectroscopia circular (CD) de polipeptídeos e proteínas com estruturas secundárias representativas.....	73

Figura 18 – Espectros de Dicroísmo Circular.....	74
Figura 19 – Presença de anticorpos nos soros dos camundongos imunizados.....	75
Figura 20 – Ensaio de <i>Immunoblotting</i> com anticorpos policlonais produzidos em camundongos.....	76
Figura 21 – Análise da reatividade contra rLIC11469 de soros de indivíduos diagnosticados para leptospirose.....	77
Figura 22 – Análise da reatividade contra rLIC11030 de soros de indivíduos diagnosticados para leptospirose.....	78
Figura 23 – Localização das proteínas codificadas pelos genes LIC11469 e LIC11030 em <i>L. interrogans</i> por imunofluorescência de fase líquida.....	80
Figura 24 – Ensaio de acessibilidade com Proteinase K.....	82
Figura 25 – Adesão das proteínas recombinantes a componentes de matriz extracelular imobilizados.....	83
Figura 26 – Experimentos de dose-dependência da ligação da proteína rLIC11469 à laminina.....	84
Figura 27 – Contribuição dos resíduos de açúcar para a interação da rLIC11469 com a laminina.....	85
Figura 28 – Ligação das proteínas recombinantes a componentes do soro humano.....	87
Figura 29 – Experimentos de dose-dependência da ligação da proteína rLIC11469 ao plasminogênio.....	87
Figura 30 – Geração de plasmina pelo plasminogênio ligado à rLIC11469.....	88
Figura 31 – Laminina e plasminogênio competem na ligação à rLIC11469.....	99
Figura 32 – Inibição da ligação de <i>L. interrogans</i> à laminina ou ao plasminogênio pela rLIC11469. ....	91
Figura 33 – Esquema simplificado dos ensaios de imunoproteção.....	92
Figura 34 – Sobrevivência dos hamsters imunizados com a proteína recombinante rLIC11469 e desafiados com <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona virulenta.....	94

**Figura 35 – Sobrevivência dos hamsters imunizados com a proteína recombinante rLIC11030 e desafiados com *L. interrogans* sorovar Pomona virulenta.....95**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 – Condições de cultivo de diferentes linhagens de <i>E. coli</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>Tabela 2 – Sequência de oligonucleotídeos empregada para amplificação dos genes nos diversos sorovares.....</b>	<b>41</b>
<b>Tabela 3 – Resumo da análise por bioinformática.....</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 4 – Proteção conferida através de imunização com proteína recombinante contra desafio letal em hamster.....</b>	<b>97</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2YT	meio de cultura contendo 1% de extrato de levedura, 1,6% de peptona e 0,5% de NaCl
2YT-ON	meio de cultura contendo 1% de extrato de levedura, 1,6% de peptona
Amp	ampicilina 100 µg/mL
BSA	albumina de soro bovino
CD	Dicroísmo Circular
cDNA	DNA complementar
Da	Dalton
ddNTP	2', 3'didesoxirribonucleotídeo
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo
DO	Densidade Ótica
DTT	Ditiotreitrol
DUF	domínio de função desconhecida
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMJH	meio de cultura Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPTG	isopropil-β-galatosídeo
Kb	kilobase
kDa	kiloDalton
LB	meio de cultura Luria Bertani, contendo 0,5% extrato de levedura; 1% triptona; 1% NaCl
LPS	lipopolissacarídeo
MAT	teste de microaglutinação
Mb	megabase
mOsM	Miliosmol
MS	Ministério da Saúde
OPD	o-fenilenodiamina
PAGE/SDS	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
pb	pares de bases
PBS	solução fosfato salina, pH 7,4
PBS-T	tampão PBS acrescido de Tween-20 0,05%
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
pI	ponto isoelétrico
PK	Proteinase K
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
RBS	sítio de ligação de ribossomo
RNA	ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RNA <sub>r</sub>	RNA ribossomal
RT	transcriptase reversa
SDS	sulfato dodecil de sódio
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVE-SP	Sistema de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TA	temperatura de anelamento
TAE	Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM
TBE	Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM
TBS	Tris 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, PMSF 1 mM
TLR	Toll-like receptor
uPA	ativador de plasminogênio tipo uroquinase
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosideo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
1.1 Classificação	20
1.2 Morfologia e biologia das leptospiras	21
1.3 A doença – Leptospirose	25
1.4 Epidemiologia	27
1.5 Diagnóstico e tratamento	28
1.6 Patogenicidade e fatores de virulência	30
1.7 Vacinas profiláticas e vacinologia reversa	33
<b>2 OBJETIVO</b>	<b>35</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
3.1 Análise por bioinformática	36
3.2 Vetores, bactérias e soros	36
3.3 Preparo de bactérias competentes	39
3.4 Extração de DNA genômico e para estudo da conservação dos genes entre diferentes cepas de <i>Leptospira</i>	40
3.5 Extração de RNA de culturas de <i>Leptospira</i> spp. e Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR)	41
3.6 Clonagem	42
3.7 Sequenciamento dos clones	44
3.8 Expressão das proteínas recombinantes	45
3.9 Purificação e diálise das proteínas recombinantes	46
3.10 Espectroscopia circular	47
3.11 Imunização	47
3.12 Detecção de anticorpos por ELISA	48
3.12.1 Detecção de anticorpos IgG por ELISA após imunização de camundongos com as proteínas recombinantes	48
3.12.2 Detecção de anticorpos IgG e IgM em soro de pacientes diagnosticados com leptospirose por ELISA	49
3.13 Obtenção do extrato proteico de <i>Leptospira</i> spp.	49
3.14 Ensaio de Immunoblotting	49
3.15 Estudos de localização celular	50
3.15.1 Imunofluorescência em fase líquida	50
3.15.2 Ensaio de acessibilidade com Proteinase K	51
3.16 Ensaio de adesão a componentes da matriz extracelular e componentes do soro humano	51
3.17 Tratamento da laminina com metaperiodato	52
3.18 Curvas de dose-resposta	52
3.19 Ensaio de atividade enzimática da plasmina	53
3.20 Interferência da laminina na ligação do plasminogênio à rLIC11469	53

<b>3.21 Inibição da ligação de leptospiros vivas à laminina ou plasminogênio pela rLIC11469</b>	<b>54</b>
<b>3.22 Imunização de hamsters para ensaio de imunoproteção</b>	<b>54</b>
3.22.1 Desafio	55
3.22.2 Teste de microaglutinação (MAT)	56
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
<b>4.1 Análise das características das proteínas selecionadas</b>	<b>57</b>
<b>4.2 Análise da conservação dos genes entre os diversos sorovares de Leptospira</b>	<b>59</b>
<b>4.3 Análise da expressão dos genes entre os diversos sorovares de Leptospira</b>	<b>61</b>
<b>4.4 Clonagem</b>	<b>63</b>
<b>4.5 Expressão das proteínas recombinantes</b>	<b>66</b>
<b>4.6 Purificação e diálise das proteínas recombinantes</b>	<b>70</b>
<b>4.7 Espectroscopia circular</b>	<b>72</b>
<b>4.8 Avaliação da atividade imunogênica das proteínas recombinantes em camundongos</b>	<b>74</b>
<b>4.9 Detecção de anticorpos IgG e IgM contra proteínas recombinantes em soros de pacientes diagnosticados com leptospirose</b>	<b>76</b>
<b>4.10 Estudos de localização celular</b>	<b>79</b>
4.10.1 Ensaio de imunofluorescência de fase líquida	79
4.10.2 Ensaio de acessibilidade com Proteinase K	81
<b>4.12 Ensaio de adesão a componentes da matriz extracelular</b>	<b>82</b>
<b>4.13 Ensaio de adesão a componentes do soro humano</b>	<b>85</b>
<b>4.14 Ensaio de atividade enzimática da plasmina</b>	<b>88</b>
<b>4.17 Avaliação do ensaio de imunoproteção em hamster</b>	<b>91</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>100</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO A - Soros humanos empregados nos imunoenaios</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO B - Cromatogramas dos sequenciamentos das construções no pAE contendo os insertos de DNA dos genes selecionados</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO C - MANUSCRITO: The novel leptospiral surface adhesin, Lsa20, binds laminin, human plasminogen and is probably expressed during infection</b>	<b>117</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, causada por espiroquetas patogênicas que pertencem ao gênero *Leptospira*. *Leptospira* spp. infectam os túbulos renais proximais de vários mamíferos e são excretadas na urina de animais reservatórios. Virtualmente todas as espécies conhecidas de mamíferos podem ser carregadores e excretadores de leptospirosas. Em humanos, a leptospirose é transmitida através da exposição à água ou solo contaminados pela urina de animais infectados. Clinicamente, pode se manifestar com sintomas de diferentes gravidades, desde sintomas brandos à forma mais severa da doença, com envolvimento de vários órgãos e alto índice de mortalidade, denominada doença de Weil (FAINE et al., 1999).

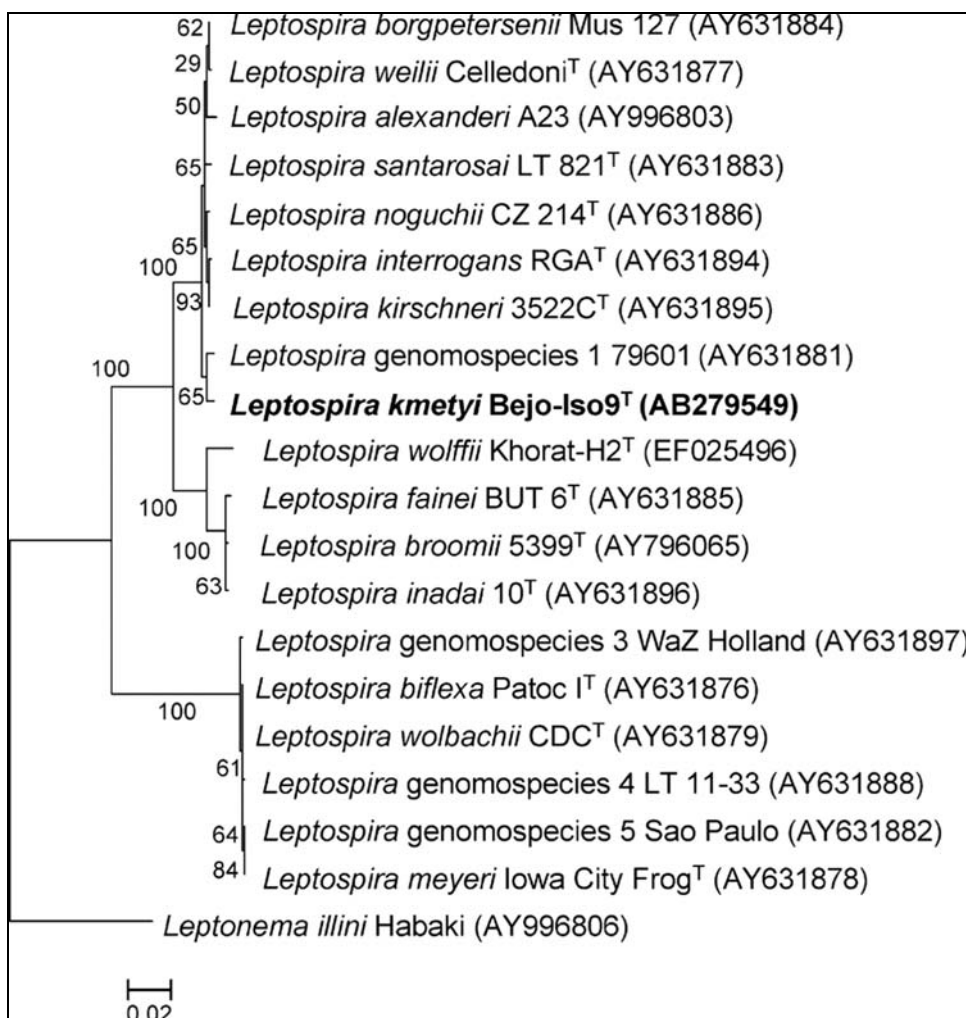
### 1.1 Classificação

Bactérias do gênero *Leptospira* são pertencentes ao reino *Eubacteriaceae*, ordem *Spirochaetales*, e família *Leptospiraceae*.

A classificação tradicional, que era utilizada até meados de 1989, especificava que todas as espécies saprofitas eram denominadas *Leptospira biflexa*, enquanto *L. interrogans* incluía todas as espécies patogênicas de leptospirosas (Plank e Dean, 2000). A classificação atual utilizada baseia-se em análises de hibridização de DNA, e indica que há pelo menos dezenove espécies (Figura 1), sendo treze patogênicas e seis saprofitas (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; LEVETT, 2001). Dentre essas espécies, *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. kirshneri* e *L. alexanderi* são os principais agentes etiológicos da leptospirose (AHMED et al., 2006).

Adicionalmente, as espécies de *Leptospira* são divididas em 24 sorogrupos e 250 sorovares, com base na expressão do lipopolissacarídeo de superfície (LEVETT et al., 2006). As diferenças estruturais nas moléculas de carboidrato do LPS determinam a diversidade antigênica dentre os sorovares (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Os sorovares que contêm determinantes antigênicos semelhantes são classificados em um sorogrupo. Análises filogenéticas do gene constitutivo 16S do RNA ribossômico (rRNA) sugerem que as espécies de

*Leptospira* podem ainda ser divididas em três grupos, designados patogênicas, saprofíticas e intermediárias (LEVETT et al., 2006; PEROLAT et al., 1998).



**Figura 1 - Análise filogenética do gene 16S do rRNA de 19 espécies representativas do gênero *Leptospira*.**

Fonte: Modificado de Slack et al., 2009.

## 1.2 Morfologia e biologia das leptospiras

Leptospiras são bactérias móveis e espiraladas de aproximadamente 0,1-0,15 µm de diâmetro por 6-20 µm de comprimento, que possuem as extremidades terminadas em gancho, o que dá sua forma característica de “sinal de interrogação” (FAINE et al., 1999). As leptospiras podem sofrer alterações morfológicas durante subcultivo *in vitro*, normalmente perdendo a virulência, que pode ser recuperada por meio de inoculação em hamster. Não são coradas pela coloração de Gram, sendo

utilizada a impregnação por sais de prata, ou observação direta em microscópio de campo escuro ou contraste de fase (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

São aeróbias obrigatórias, com temperatura ótima de crescimento de 28-30 °C. Crescem em meio simples enriquecidos com vitaminas B1 e B12, sais de amônia e ácidos graxos de cadeia longa como única fonte de carbono, que são metabolizados pela via da  $\beta$ -oxidação. O meio de cultura comumente utilizado é o Ellinghausen-McCullough/Johnson-harris (EMJH), que contém ácido oléico, albumina de soro bovino e polissorbato (Tween) (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Possuem crescimento relativamente lento, e podem ser cultivadas tanto em meio líquido quanto sólido.

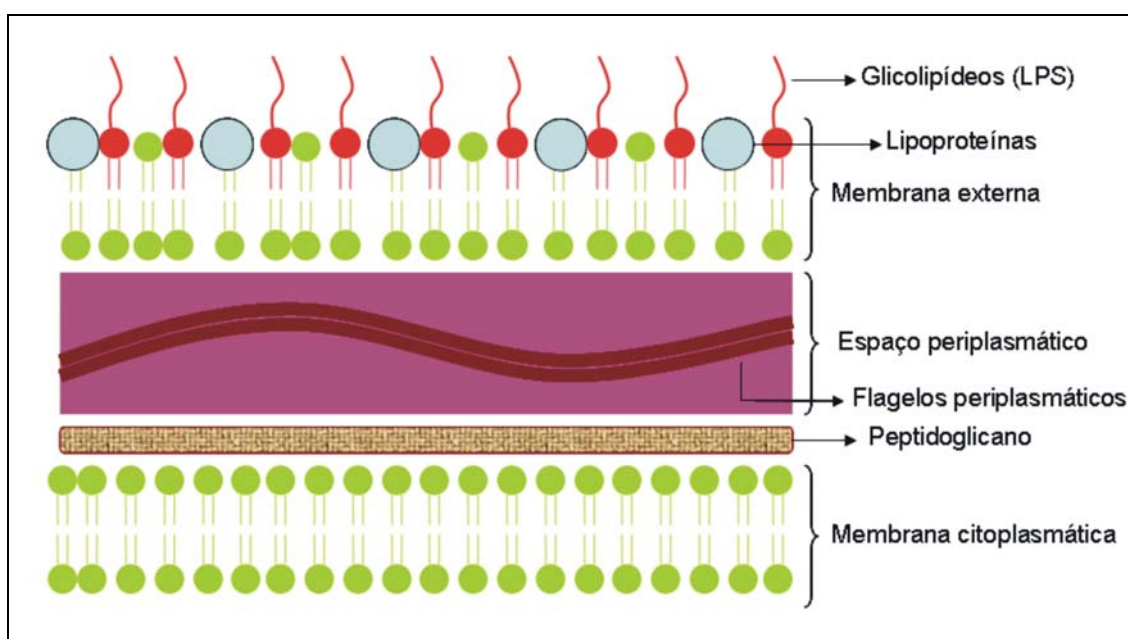
Os mecanismos de patogênese de *Leptospira* são pouco conhecidos; no entanto, recentemente, um significativo progresso tem sido alcançado. Atualmente estão disponíveis a sequência genômica completa das espécies patogênicas *L. interrogans* sorovares Lai (REN et al., 2003) e Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004b), duas cepas de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo (BULACH et al., 2006), além de duas cepas da espécie saprofítica *L. biflexa* (PICARDEAU et al., 2008).

O genoma leptospiral possui cerca de 3,9-4,6 Mpb, dependendo da cepa e espécie, e é composto de dois cromossomos circulares. Em *L. biflexa* é encontrado um terceiro replicon circular designado p74, que não é encontrado em cepas patogênicas; no entanto, treze genes constitutivos encontrados no p74 estão presentes no cromossomo I das cepas patogênicas, sendo esse replicon relacionado à sobrevivência de *L. biflexa*, uma vez que mutações nesses genes constitutivos afetam a viabilidade da bactéria (PICARDEAU et al., 2008).

Algumas cepas patogênicas, como *L. interrogans*, podem viver em ambientes pobres em nutrientes, como solo úmido e água fresca, por longos períodos (cerca de 110 dias), sendo fatores críticos a concentração de sais, o pH e a viscosidade (TRUEBA et al., 2004). No entanto, a espécie *L. borgpetersenii*, que possui o genoma cerca de 700 kb menor do que o genoma de *L. interrogans*, não sobrevive fora do hospedeiro. Análises genômicas indicam que a perda de genes críticos para sobrevivência fora do hospedeiro limita sua transmissão através de contato direto de hospedeiro para hospedeiro (BULACH et al., 2006). Além disso, Ristow et al. (2008) demonstraram que leptospiros são capazes de se agregar para formar biofilmes, sendo as cepas saprofíticas são mais eficazes nesse processo, que pode ser um

dos mecanismos empregados para sobrevivência em nichos ambientais (RISTOW et al., 2008).

Leptospiras possuem estruturas de superfície que dividem características de ambas as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Figura 2). A dupla membrana e a presença de moléculas de lipopolissacarídeo são características de bactérias Gram-negativas, enquanto a associação da membrana citoplasmática com parede celular de peptidoglicano é semelhante à arquitetura de Gram-positivas (HAAKE, 2000; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; LEVETT, 2001). Na membrana externa, o LPS constitui o principal antígeno de *Leptospira*, sendo também um fator de virulência, uma vez que Murray et al. (2010) mostraram que *L. interrogans* sorovar Manilae, mutantes em proteínas envolvidas na biossíntese de LPS, perdem a virulência em infecção experimental de hamsters (MURRAY et al., 2010).



**Figura 2 - Modelo da estrutura da membrana de *Leptospira* spp.** Leptospiras possuem duas membranas, uma membrana externa e uma membrana citoplasmática ou interna. Da mesma forma que as bactérias Gram-negativas a parede de peptidoglicano é intimamente associada à membrana interna. A superfície da leptospira apresenta lipopolissacarídeos justapostos. No espaço periplasmático, são encontrados dois flagelos periplasmáticos que dão motilidade à bactéria.

Embora seja estruturalmente e imunologicamente similar ao LPS de outras bactérias Gram-negativas, o LPS leptospiral é relativamente não-tóxico para células ou animais, sendo cerca de doze vezes menos letal para camundongos quando comparado ao LPS de *Escherichia coli* (FAINE et al., 1999). O Lipídeo A, que é parte



constituente do LPS, nas leptospiras possui características únicas, como a unidade de dissacarídeo glucosamina que é fosforilada e metilada (QUE-GEWIRTH et al., 2004).

Devido a essa estrutura única do Lipídeo A, o sistema imune inato humano falha em reconhecer LPS leptospiral via Toll-like receptor 4 (TLR4), o receptor clássico de LPS (HAAKE e MATSUNAGA, 2010). Esse é um fator chave que contribui para a suscetibilidade de humanos à infecção leptospiral, já que macrófagos murinos são capazes de detectar LPS leptospiral via TLR4 e TLR2, enquanto macrófagos humanos são capazes de reconhecer essa molécula apenas através de TLR2 (NAHORI et al., 2005; WERTS et al., 2001). Reforçando essa hipótese, experimentos de Chassin et al. (2009) mostraram que camundongos com TLRs intactos eram resistentes à infecção, enquanto camundongos TLR4/TLR2 duplo *knockout* eram altamente suscetíveis à infecção leptospiral. Esses dados sugerem ainda que a habilidade de o sistema imune inato responder a LPS leptospiral via TLR4 podem servir como uma das características de um hospedeiro reservatório (CHASSIN et al., 2009).

Além do LPS, um grande número de proteínas estruturais e funcionais forma parte da membrana externa. Um grande número dessas proteínas é formado por lipoproteínas, como LipL32, LipL21 e LipL41 (CULLEN et al., 2005). As lipoproteínas são as proteínas mais predominantes na membrana das espiroquetas e apresentam-se ancoradas através da porção amino-terminal por ligação covalente a um ácido graxo constituinte da membrana. A lipidação ocorre através de clivagem enzimática do peptídeo sinal através da peptidase sinal II, que reconhece a sequência lipobox na terminação do peptídeo sinal de lipoproteínas. Por estarem localizadas na superfície da bactéria, as lipoproteínas desempenham várias funções relacionadas à adaptação e interação com o meio ambiente (CULLEN et al., 2005; HAAKE, 2000; HAAKE e MATSUNAGA, 2002). Adicionalmente, proteínas integrais como a porina OmpL1 (SHANG et al., 1995) são localizadas na membrana externa de *Leptospira*. Novas técnicas de proteômica tornaram possível aprender mais a respeito da composição proteica de *L. interrogans* (MALMSTROM et al., 2009). Malmström et al. (2009) adaptaram cromatografia líquida e espectrometria de massa (LC-MS/MS) para determinar o número de cópias de proteínas por célula. Seus resultados demonstraram que, assim como em *Borrelia* spp., as lipoproteínas leptospirais são de fato as proteínas de membrana externa predominantes. A lipoproteína majoritária

de membrana externa, LipL32, é a proteína mais abundante, com 38.000 cópias por célula (MALMSTROM et al., 2009).

A motilidade nas leptospirosas é devido à presença de dois flagelos periplasmáticos, ou endoflagelos, que possuem inserções polares e são localizados no espaço periplasmático; as proteínas FlaA e FlaB constituem a bainha e o core flagelar, respectivamente, de forma que mutantes no gene *flaB* não possuem endoflagelos e nem motilidade (PICARDEAU; BRENOT; SAINT GIRONS, 2001). Adicionalmente, a motilidade é considerada um fator de virulência em leptospirosas, uma vez que bactérias patogênicas mutantes no gene *fliY*, que codifica a proteína FliY do motor flagelar, perdem a virulência e são incapazes de causar infecção em porquinhos-da-índia (LIAO et al., 2009). Outros fatores de virulência de *Leptospira* descritos, além do LPS e da motilidade, são a proteína de membrana externa Loa22 (RISTOW et al., 2007), e a enzima heme oxigenase (MURRAY et al., 2008). Adicionalmente, Atzingen et al. (2008) mostraram pela primeira vez, através de imunohistoquímica, a presença da proteína de membrana Lsa21 em rins e fígado provenientes de casos fatais de leptospirose em humanos. Essa proteína leptospiral é também uma adesina, apresentando ligação à laminina, colágenos tipo I e IV, e fibronectina celular e plasmática; além disso, tem sua expressão diminuída pelo número de passagens em cultura, e aumentada quando a bactéria é cultivada em meio enriquecido com sais, mimetizando condições fisiológicas. Esses dados reforçam a hipótese de que a Lsa21 é um fator de virulência de *Leptospira* (ATZINGEN et al., 2008).

### 1.3 A doença – Leptospirose

A infecção ocorre através de contato direto com urina de animais infectados, ou indiretamente através de água contaminada. Quase todo mamífero pode ser transmissor de leptospirosas; no entanto, os roedores são os principais reservatórios da doença, carregando as espiroquetas nos túbulos proximais renais, e excretando altas concentrações de leptospirosas (cerca de  $10^7$  organismos/mL) no ambiente por meses (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Dentre os roedores domésticos, o *Rattus norvegicus* possui maior importância epidemiológica, pois é portador clássico de *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae, que abrange os sorovares mais patogênicos ao homem (FAINE et al., 1999; KO; GOARANT;

PICARDEAU, 1999). Humanos são considerados hospedeiros acidentais, uma vez que a transmissão entre humanos não é relatada, normalmente sofrem de infecções agudas e algumas vezes fatais (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

As leptospiras penetram ativamente através de mucosas, de pele lesionada ou da pele íntegra, exposta por tempo prolongado a água contaminada. Após a penetração, as leptospiras percorrem as vias linfáticas e sanguíneas, atingindo vários órgãos, especialmente os túbulos renais, nos quais se multiplicam e são eliminadas através da urina (FAINE et al., 1999).

O tempo de início da doença em humanos é variável, variando de um dia a quatro semanas após exposição, podendo durar meses nos sobreviventes (LEVETT, 2001). A leptospirose pode apresentar uma ampla variedade de manifestações clínicas; a severidade da doença depende da cepa de *Leptospira* envolvida, a carga de leptospiras, assim como a idade e condição imune do indivíduo infectado. A maioria dos casos documentados é caracterizada por quadros clínicos leves e torna-se difícil distinguir de outras doenças, até que o diagnóstico laboratorial seja feito. Outros sintomas incluem febre alta com calafrios, cefaleia, mal estar geral grave, lombalgia, dor muscular acentuada nos membros inferiores e congestão conjuntival, sendo estes últimos mais característicos (FAINE et al., 1999; KOBAYASHI, 2001).

A forma mais severa da doença é a síndrome de Weil, que acomete de 5 a 15% dos pacientes, e possui uma taxa de mortalidade de 4-50%. É caracterizada por complicações sistêmicas envolvendo vários órgãos; icterícia, meningite, hemorragia pulmonar, disfunções hepáticas e renais, e colapso cardiovascular são os sintomas característicos. Além disso, todos os órgãos afetados apresentam injúrias vasculares e lesões endoteliais (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; LEVETT, 2001). Náusea e vômito são observados nos pacientes mais graves (FAINE et al., 1999; KOBAYASHI, 2001). Adicionalmente, a forma severa normalmente está associada aos sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni e Lai (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Além da síndrome de Weil, a chamada síndrome de hemorragia pulmonar associada à leptospirose (LPHS) tem sido foco de atenção. No entanto, ela pode ser subdiagnosticada mesmo em regiões altamente endêmicas (MCBRIDE et al., 2005; SEGURA et al., 2005). Os sintomas podem ser moderados e não específicos, incluindo dor no peito, tosse e dispnéia, que aparecem usualmente entre o quarto e

sexto dia da doença e pode levar à morte em menos de 72 horas. Além disso, severidade da forma respiratória da doença não está relacionada à presença de icterícia. Os índices de mortalidade podem chegar a 30-70% na LPHS (TOYOKAWA; OHNISHI; KOIZUMI, 2011).

#### **1.4 Epidemiologia**

A leptospirose é uma doença sistêmica de humanos e animais domésticos, afetando principalmente cães, gado e suínos, e é considerada a zoonose mais disseminada geograficamente (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). O sudeste da Ásia, Oceania, Índia e América Latina são os lugares de maior incidência da doença. Nessas regiões, mudanças climáticas e enchentes, saneamento precário e altas populações de hospedeiros reservatórios (como ratos) são determinantes importantes (VICTORIANO et al., 2009).

Na última década, no entanto, houve mudanças no padrão epidemiológico da leptospirose humana. Em regiões onde a doença não é comum, como Canadá, Estados Unidos e Europa, ocorreram surtos esporádicos associados com atividades aquáticas de lazer em ambientes contaminados com leptospiras patogênicas, ou associados a mudanças climáticas (CICERONI et al., 2000; MORGAN et al., 2002; STERN et al., 2010).

Há uma associação ocupacional, especialmente em países desenvolvidos, com agricultura e produção animal (criação de gado ou porcos e abatedouros), e um risco universal de infecção mediada por roedores, especialmente em países tropicais, onde vários sorovares podem estar presentes (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica (BRASIL, 2005), ocorrendo em todas as regiões do país, com maior frequência nos meses quentes e úmidos (FAINE et al., 1999; KOBAYASHI, 2001; VINETZ, 2001) e em áreas metropolitanas, onde a disseminação é favorecida por fatores como enchentes, condições inadequadas de saneamento e habitação (como observado em favelas) e grande número de roedores infectados (KO; GOARANT; PICARDEAU, 1999).

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN - <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>, último acesso em 25 de julho de 2011) do Ministério da Saúde, em 2010 foram confirmados 3.661 casos de

leptospirose, sendo que as Regiões Sudeste e Sul apresentaram maior número (40% e 32% do total, respectivamente), seguidas pelas Regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste (19%, 7% e 2% do total, respectivamente). O maior índice de casos relatados encontra-se no estado de São Paulo, 840 (23% do total de casos confirmados no Brasil). Na Região Sudeste também ocorreu o maior número de óbitos por leptospirose - 369, com coeficiente médio de incidência de 1,97 para cada 100.000 habitantes. Desse total, 45% equivalem ao número de óbitos ocorridos somente no estado de São Paulo (167) em 2010.

A leptospirose causa também grande impacto econômico no setor da pecuária, já que a doença em outros mamíferos como gado, porcos, ovelhas, cabras e cavalos pode causar problemas reprodutivos, nascimentos precoces e abortos, além de redução no ganho de peso, mastite e morte prematura (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

As medidas de controle da doença são direcionadas ao controle de roedores, à melhoria das condições higiênico-sanitárias da população e alterações do meio ambiente (KO; GOARANT; PICARDEAU, 1999; BRASIL, 2005). Entretanto, estas medidas não são fáceis de serem implementadas, de modo que o desenvolvimento de vacinas profiláticas é a estratégia de prevenção mais promissora (LEVETT, 2001).

### **1.5 Diagnóstico e tratamento**

O tratamento envolve combinação de antibióticos, como doxiciclinas e penicilinas, e terapia de suporte. Nos casos graves, onde há complicações renais, respiratórias ou hemorrágicas, os pacientes devem ser encaminhados a hospitais que disponham de capacidade para realizar procedimentos como diálise e terapia intensiva. Assim, a leptospirose representa um problema econômico para o sistema de saúde pública (FAINE et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 1999; LEVETT, 2001).

Os métodos empregados para diagnóstico da leptospirose são usualmente sorológicos; no entanto, mais de uma técnica é utilizada para confirmação da doença. A técnica recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é o teste de micro-aglutinação (MAT - *microscopic agglutination test*) no qual antígenos de leptospirosas vivas representando mais de 20 sorogrupos são submetidos à reação

com amostras de soro de pacientes para detectar anticorpos através da aglutinação (LEVETT, 2003). Dados derivados deste ensaio são utilizados para identificar o sorovar ou sorogrupo de leptospira infectante; porém reações cruzadas entre os sorogrupos são comuns. Além disso, há dificuldade adicional, devido a necessidade de manter um grande número de culturas de diferentes sorovares (LEVETT, 2003).

Durante a fase aguda, se há suspeita de leptospirose, recomenda-se adicionalmente a cultura de leptospiros e Reação de Polimerase em Cadeia (PCR); pode também ser recomendado um teste ELISA para procura de anticorpos IgM específicos contra componentes de leptospiros patogênicas, como a proteína não-caracterizada de 35kDa (SAENGJARUK et al., 2002; TULSIANI et al., 2010). O sangue coletado do paciente com suspeita de leptospirose é então utilizado para cultura em meio específico. No entanto, num isolamento primário, o crescimento de leptospiros é lento, o que dificulta o diagnóstico na fase aguda da doença, onde o tratamento é mais eficaz (TOYOKAWA; OHNISHI; KOIZUMI, 2011; TULSIANI et al., 2010). Recentemente, alguns protocolos de PCR foram propostos para diagnosticar leptospirose e identificar o sorogrupo (BAROCCHI et al., 2001; FONSECA CDE et al., 2006; MAYER-SCHOLL et al., 2010). Vários genes, incluindo *secY*, *rrs*, *flaB*, *liaA* e *lig B*, *lipL32*, *rrl* e o locus genômico LA3521 tem sido usados como alvos para diagnóstico baseado em PCR (BROWN et al., 1995; FONSECA et al., 2006; KOIZUMI et al., 2003; KOSITANONT et al., 2007; MERIEN; BARANTON; PEROLAT, 1995). O DNA pode ser amplificado de amostras de sangue, urina, fluido cerebrospinal, humor aquoso e tecidos (BROWN et al., 2003; LEVETT, 2001). Um protocolo de PCR baseado na procura do gene da flagelina *secY* está descrito no manual da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Além desses protocolos para diagnóstico laboratorial, em 2010 foi divulgado o estudo de um novo método promissor, em desenvolvimento por pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Nesse método, um cartão contendo a proteína leptospiral de membrana externa LigA adsorvida permite que a reação antígeno-anticorpo com uma gota de sangue do paciente suspeito confirme a doença em cerca de 15 minutos (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2010).

## 1.6 Patogenicidade e fatores de virulência

Os mecanismos moleculares de patogênese da leptospirose permanecem pouco conhecidos até o momento. Vários possíveis fatores de virulência que devem contribuir para a infecção por *Leptospira* têm sido identificados, incluindo LPS, hemolisinas, proteínas de membrana externa (OMPS – “outer membrane proteins”) e outras proteínas de superfície, assim como moléculas de adesão.

A análise *in silico* das sequências do genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni permitiu a identificação de um grande número de lipoproteínas e proteínas transmembrana que podem estar envolvidas na patogênese e conferir proteção imunológica. Das lipoproteínas identificadas, 174 são hipotéticas, ainda não identificadas em outro organismo (NASCIMENTO et al., 2004a). Além disso, a comparação entre sequências de cepas patogênicas e não patogênicas revelou que 656 genes são específicos de cepas patogênicas, dentre os quais as funções de aproximadamente 60% deles é desconhecida, o que sugere a existência de mecanismos de virulência únicos de leptospiros patogênicos (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

A adesão de leptospiros a componentes teciduais do hospedeiro é uma etapa inicial e necessária para infecção e patogênese. Dessa forma, a ligação a células do hospedeiro e componentes da matriz extracelular (ECM) parece ser necessária para que leptospiros penetrem, se disseminem e persistam nos tecidos do hospedeiro mamífero (BREINER et al., 2009).

Leptospiros patogênicos expressam um grande número de proteínas que são ao menos parcialmente expostas na superfície, incluindo proteínas de membrana externa da família das proteínas bacterianas semelhantes a imunoglobulina, LigA, LigB e LigC (Lig, “*leptospiral immunoglobulin-like*”). Ambas LigA e LigB ligam a componentes da ECM, como elastina, colágenos I e IV, laminina e fibronectina (CHOY et al., 2007; LIN et al., 2009a, 2009b). No entanto, um *knockout* de *ligB* não afetou a virulência e colonização de hamsters infectados, o que sugere a presença de outras proteínas capazes de interações similares com o hospedeiro (CRODA et al., 2008).

Adicionalmente, LigA e LigB também mostraram-se potenciais candidatos vacinais (KOIZUMI e WATANABE, 2004; PALANIAPPAN et al., 2006; SILVA et al., 2007). Koizumi e Watanabe (2004) empregaram camundongos C3H/HeJ, sucetíveis

a leptospirose pois falham em produzir resposta contra LPS via TLR4, vacinados com as proteínas LigA e LigB clonadas a partir de *L. interrogans* sorovar Manilae em um ensaio de desafio, e obtiveram 90% de proteção (KOIZUMI e WATANABE, 2004). Em outro estudo, hamsters imunizados com rLigA sobreviveram a infecção com *L. interrogans* sorovar Pomona, não apresentaram alteração morfológica significativa em seus rins e a proteção conferida foi esterelizante, ou seja, não foram encontradas leptospiros após de cultura de rins (PALANIAPPAN et al., 2006). O fragmento LigANI, que representa os domínios semelhantes a imunoglobulina da região C-terminal da proteína LigA, conferiu imunoproteção não esterelizante de 67-100% em hamsters desafiados com *L. interrogans* serovar Copenhageni (SILVA et al., 2007). Adicionalmente, o fragmento rLigBcon da proteína LigB conferiu proteção de 71% e menor gravidade nas lesões histopatológicas (YAN et al., 2008).

Um grande número de proteínas de *L. interrogans* mostrou ligação ao componente da ECM laminina. Uma das proteínas leptospirais de ligação à laminina caracterizada é a Lsa24/LfhH ou LenA, que também mostrou ligação à proteína reguladora do sistema complemento Fator H, e também fibrinogênio e fibronectina (BARBOSA et al., 2006; STEVENSON et al., 2007; VERMA et al., 2010, ; VERMA et al., 2006). Outras proteínas leptospirais de ligação à laminina identificadas são Lsa21 (ATZINGEN et al., 2008), Lsa27 (LONGHI et al., 2009), Lsa63 (VIEIRA et al., 2010) e uma proteína de membrana de 36kDa (MERIEN et al., 2000). Adicionalmente, Lsa27 e Lsa63 são expostas na superfície e reativas com soros de pacientes diagnosticados com leptospirose (LONGHI et al., 2009; VIEIRA et al., 2010), sugerindo seu possível papel na adesão ao hospedeiro e patogênese.

A invasividade de leptospiros parece estar também relacionada à evasão ao complemento, o maior componente do sistema imune inato, envolvido na proteção contra patógenos devido a suas atividades de opsonização, inflamação e lise (BLOM, 2002). A resistência ao complemento está correlacionada a capacidade de ligação ao fator H e à proteína 1 relacionada ao fator H (FHL-1 – *factor H related protein 1*), que são as principais reguladoras da via alternativa do complemento (MERI et al., 2005). Além disso, recentes estudos indicam que ambas leptospiros patogênicas e intermediárias são capazes de ligar a C4BP, outra proteína reguladora do complemento, ao passo que a espécie saprofítica *L. biflexa* Patoc I não liga à C4BP (BARBOSA et al., 2009). É válido ressaltar que a resistência ao complemento não depende do número de passagens em cultura, uma vez que a



perda de virulência não implica na perda da expressão às proteínas ligantes de Fator H e C4BP e, portanto, não afeta a ligação à essas proteínas reguladoras (CINCO, 2010).

A interação ao plasminogênio humano tem sido sugerida como uma característica que contribui significativamente para a virulência de muitos patógenos por facilitar a ancoragem inicial ao endotélio. Através da captura do plasminogênio do hospedeiro em sua superfície, seguida pela ativação em plasmina, a bactéria se torna um organismo proteolítico, uma característica que contribui para a degradação de componentes da ECM, penetração tecidual e invasão ( LAHTEENMAKI; KUUSELA; KORHONEN, 2001). Foi demonstrado que leptospiros ligam-se ao plasminogênio humano e este pode ser convertido em plasmina na presença do ativador (VIEIRA et al., 2009). Além disso, recentemente foram identificadas oito proteínas leptospirais, LipL32, Lp29, Lp49, LipL40, MPL36, rLIC10494, rLIC12730 e rLIC12238, que se ligam ao plasminogênio, sendo o plasminogênio ligado à proteína capaz de gerar plasmina enzimaticamente ativa (VIEIRA et al., 2010).

A lipoproteína LipL32 é altamente conservada apenas em espécies patogênicas e expressa durante a infecção humana (HAAKE et al., 2000). Essa OMP leptospiral majoritária também liga à laminina, colágenos I, IV e V, e fibronectina (HAAKE et al., 2000; HAUK et al., 2008; HOKE et al., 2008). No entanto, mutantes no gene lipL32 não diferem de leptospiros selvagens em morfologia, crescimento, ou adesão à ECM, e não têm a virulência atenuada em modelos animais infectados (MURRAY et al., 2009).

Com relação a ensaios de imunoproteção, hamsters imunizados com o bacilo Calmette-Guerin recombinante (rBCG) expressando LipL32 apresentaram de 32-55% de proteção contra desafio letal de *L. interrogans* serovar Copenhageni (SEIXAS et al., 2007). No entanto, em um recente estudo, Lucas et al. (2011) observaram que a proteína recombinante LipL32 não conferiu nenhuma proteção em hamsters imunizados e desafiados com *L. interrogans* serovar Manilae (LUCAS et al., 2011). Adicionalmente, nenhum estudo utilizando LipL32 demonstrou até o momento 100% de proteção em um desafio apropriado, ou seja, com baixa sobrevivência no grupo controle negativo.

Haake et al. (1999) empregaram as membrana externa OmpL1 e LipL41 em uma única vacina, avaliando o efeito sinérgico de ambas na proteção contra a leptospirose em hamsters. A combinação das proteínas conferiu 71% de proteção,

enquanto isoladamente conferiram apenas 42% e 23%, respectivamente (HAAKE et al., 1999). A proteína de membrana OmpL1 apresentou proteção cruzada (25-62,5%) em desafio empregando *L. interrogans* sorovar Lai e Autumnalis e *L. borgpetersenii* sorovar Ballum em porquinhos-da-índia (DONG et al., 2008).

Loa22, o primeiro fator de virulência de *Leptospira* descrito, é uma lipoproteína com um motivo de ligação à peptidoglicano similar a OmpA, e é mais expressa durante infecção leptospiral aguda (KOIZUMI e WATANABE, 2003; NALLY et al., 2007; RISTOW et al., 2007). No entanto, a função de Loa22 permanece desconhecida. Embora seja altamente conservada em espécies patogênicas e saprofíticas, um mutante em *loa22* se mostrou não virulento em modelos animais de porquinho-da-índia e hamster (RISTOW et al., 2007), o que sugere Loa22 como um candidato promissor para o desenvolvimento de uma vacina.

### **1.7 Vacinas profiláticas e vacinologia reversa**

Atualmente se encontram disponíveis vacinas veterinárias que empregam bactérias inativadas ou preparações de membrana de leptospiros patogênicas, que geram anticorpos protetores direcionados contra o LPS leptospiral (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Entretanto, essas vacinas não causam proteção duradoura, sendo necessária revacinação anual ou até mesmo semestral (BOLIN; ZUERNER; TRUEBA, 1989a; 1989b) e também não promovem proteção cruzada contra bactérias de sorogrupos diferentes das utilizadas na preparação da vacina.

Em países como China e Cuba já existem vacinas aprovadas para uso em humanos, com as mesmas características das vacinas de uso veterinário (MARTINEZ et al., 2004; YAN et al., 2003). Porém, o emprego de preparações com bactérias inativadas acarreta efeitos colaterais, como febre e dor no local da aplicação, além da proteção de curto prazo (ATZINGEN, 2009).

A busca de antígenos conservados em um grande número de sorovares e que tenham efeito imunoprotetor é o grande foco na pesquisa sobre leptospirose. As proteínas de superfície da bactéria são os candidatos vacinais considerados mais promissores, por estarem diretamente envolvidas na interação das bactérias com a célula hospedeira (CULLEN et al., 2003; PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007).

Os projetos genoma propiciaram novas ferramentas para o desenvolvimento de vacinas, uma vez que permitem a identificação de candidatos vacinais independente de suas características de expressão (ADU-BOBIE et al., 2003; GAMBERINI et al., 2005; KOIZUMI e WATANABE, 2005a; KOIZUMI e WATANABE, 2005b; MEDINI et al., 2008; RAPPUOLI, 2000; SERRUTO e RAPPUOLI, 2006). A sequência completa do genoma da *Neisseria meningitidis* sorogrupo B (TETTELIN et al., 2000) levou ao surgimento de uma nova estratégia para identificação de candidatos vacinais através de análise *in silico* das proteínas de superfície (PIZZA et al., 2000). Esta estratégia foi empregada com sucesso na busca de antígenos vacinais contra infecção por *Streptococcus pneumoniae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, entre outros (WIZEMANN et al., 2001; ROSS et al., 2001; MONTIGIANI et al., 2002; REID et al., 2001; REID et al., 2002).

A partir da sequência genômica de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, foram selecionados para o presente estudo seis genes que codificam proteínas hipotéticas de membrana externa: um codifica uma proteína hipotética (LIC10411) e cinco codificam prováveis lipoproteínas (LIC11469, LIC11030, LIC10827, LIC12891 e LIC13305). O critério empregado para a seleção destes genes foi baseado em programas de bioinformática que predizem a localização celular das proteínas.

## 2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é caracterizar lipoproteínas de *Leptospira interrogans* utilizando *Escherichia coli* como sistema hospedeiro de expressão. Avaliar a conservação entre diferentes sorovares, a localização celular da proteína nativa correspondente, a imunorreatividade frente a soros de pacientes diagnosticados com leptospirose, a interação com componentes de matriz extracelular, e a imunoproteção em modelo animal (hamster).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

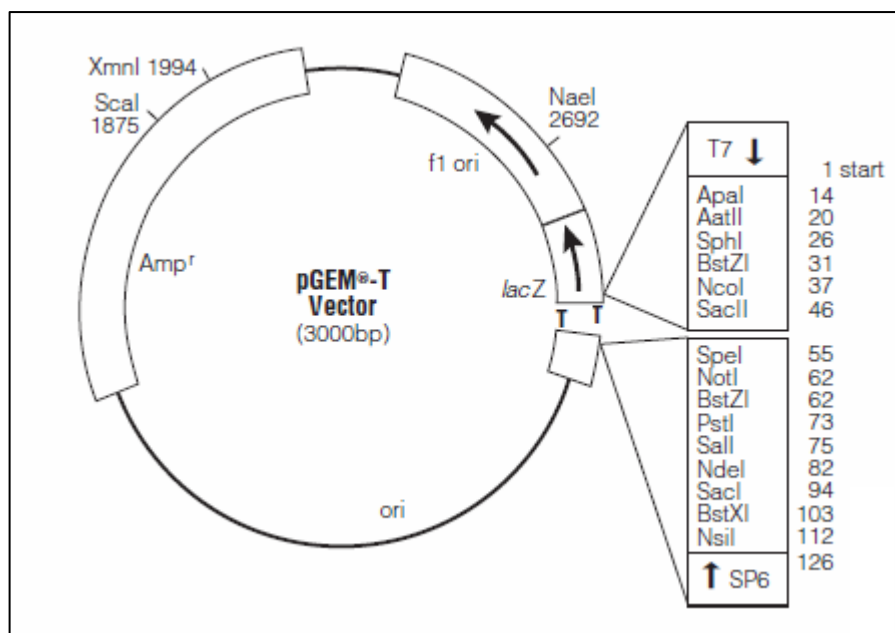
#### 3.1 Análise por bioinformática

Os genes foram selecionados do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, disponível no servidor público: <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/> (NASCIMENTO et al., 2004b). Esta seleção teve como base a localização celular das proteínas hipotéticas codificadas por estes genes, que foi feita através do programa PSORT (NAKAI e KANEHISA, 1991; NAKAI e HORTON, 1999). A presença de sinal de clivagem ou lipidação foi avaliada com auxílio do programa LipoP (JUNCKER et al., 2003). Os cálculos de massa molecular e pI teórico das proteínas recombinantes que foram realizados a partir da composição de aminoácidos, utilizando o programa ProtParam (GASTEIGER, 2006)

Os genes também foram analisados pelos programas SMART (LETUNIC et al., 2006; SCHULTZ et al., 1998) e PFAM (FINN et al., 2006; SONNHAMMER; EDDY; DURBIN, 1997), para verificar a presença de domínios conservados. O programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990; ALTSCHUL et al., 1997), foi usado para analisar as similaridades destas sequências com a de outras espécies e sorovares de *Leptospira* presentes no banco de dados.

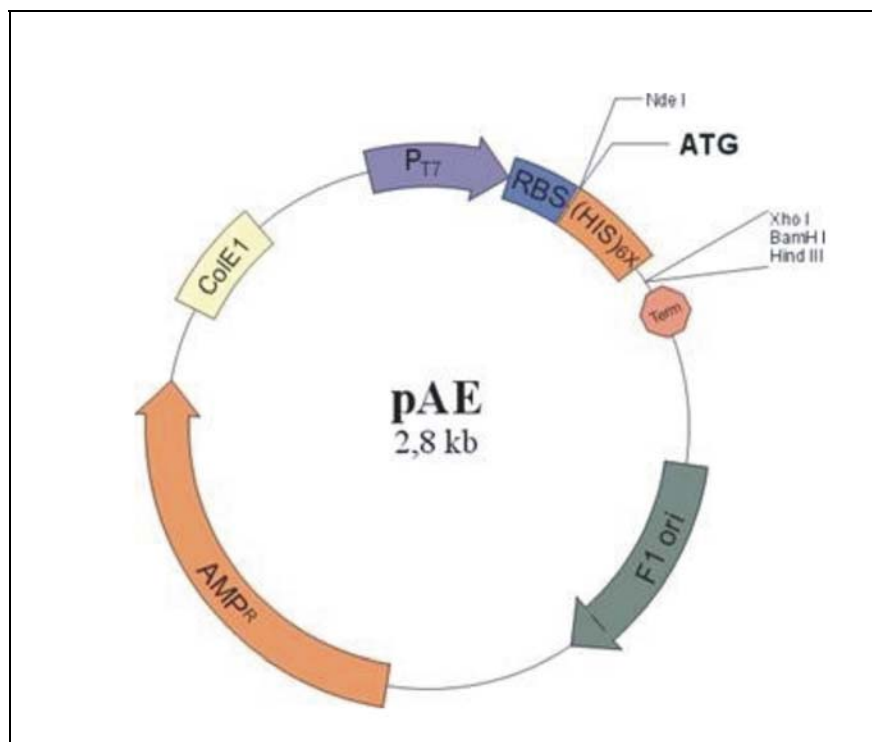
#### 3.2 Vetores, bactérias e soros

O vetor pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, WI, Estados Unidos) foi utilizado para otimizar as reações de digestão com as enzimas específicas de cada clonagem (Figura 3). Este vetor é fornecido pelo fabricante pronto para o uso, preparado a partir da digestão do pGEM-5Zf (+) com *EcoR* V e adição de timidinas nas extremidades 3' obtidas. Estas timidinas possibilitam a ligação dos produtos de PCR, pois estes normalmente possuem uma adenosina em cada extremidade 3', adicionada pela atividade transferase terminal da *Taq* polimerase (PROMEGA TECHNICAL MANUAL, 2010).



**Figura 3 - Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy.** **f1ori:** origem de replicação. **Amp<sup>r</sup>:** gene de resistência a ampicilina. **lacZ:** gene para metabolismo de lactose ( $\beta$ -galactosidase).  
 FONTE: Promega (2010).

O vetor de expressão pAE (Figura 4) foi construído no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan (RAMOS et al., 2004) a partir do pRSETA (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) e pET3-His, cedido pelo Dr. Seiichi Yasuda do Instituto Nacional de Genética do Japão. O vetor pAE foi desenvolvido para expressar proteínas recombinantes contendo uma cauda de 6 resíduos de histidina na região N-terminal, o que permite a purificação das mesmas por coluna de cromatografia carregada com níquel. Este vetor é constituído pelo promotor do fago T7 (*pT7*), sendo que a expressão das proteínas recombinantes só ocorre na presença da T7 RNA polimerase. Este vetor também possui sítio de ligação ao ribossomo, sítios de múltiplas clonagens (MCS), códon ATG de início de transcrição e terminador de transcrição (T7 term.).



**Figura 4 - Mapa do vetor de expressão pAE.** P<sub>T7</sub>: promotor. (His)<sub>6x</sub>: sequência codificadora para seis resíduos de histidina. RBS: sítio de ligação ao ribossomo. ATG: códon de início da transcrição. Term: região de terminação de transcrição (T7). F1 ori: origem de replicação. Amp<sup>R</sup>: gene de resistência à ampicilina.

A linhagem *E. coli* DH5α<sup>TM</sup> (Invitrogen) foi utilizada para seleção de clones positivos, provenientes das clonagens dos produtos de PCR no vetor pGEM-T Easy e subclonagens dos insertos de DNA no vetor de expressão pAE.

As linhagens de *E. coli* BL21 SI (Invitrogen) e BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) pLys (Invitrogen) foram utilizadas para expressão de proteína recombinante.

Os diferentes sorovares de *Leptospira* spp utilizados neste trabalho foram cedidos pelo Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. Estas cepas foram cultivadas em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH, Difco TM, Le Pont de Claix, França) modificado (TURNER, 1970), a temperatura de 28 °C. As leptospiros se duplicam aproximadamente a cada 16 horas, e o crescimento é lento num isolamento primário, de modo que as culturas são mantidas por cerca de treze semanas antes de serem descartadas (LEVETT, 2001). As leptospiros de subculturas são mantidas por cerca de 14 dias, e em seguida são novamente subcultivadas (para mantê-las não virulentas) ou inoculadas em hamster e posteriormente isoladas para recuperar a virulência.

Os quarenta soros pareados, de pacientes diagnosticados com leptospirose utilizados neste estudo fazem parte de uma soroteca e foram cedidos pela Dra. Eliete C. Romero do Instituto Adolfo Lutz, conforme ANEXO A.

### 3.3 Preparo de bactérias competentes

Para o preparo de bactérias *E. coli* competentes de diferentes cepas, utilizamos o método descrito por Hanahan em 1983 (HANAHAN, 1983). Inicialmente a linhagem escolhida foi estriada em placas de meio sólido contendo o meio de cultura apropriado, e incubada na temperatura adequada por 16 horas (Tabela 1).

**Tabela 1 - Condições de cultivo de diferentes linhagens de *E. coli*.**

Linagem bacteriana	Meio de cultura	Temperatura
DH5- $\alpha$	LB ou 2YT	37 °C
BL21 Star (DE3) pLysS	LB ou 2YT / cloranfenicol	37 °C
BL21 SI	2YT/ON	30 °C

NOTAS: LB: meio de cultura Luria Bertani (0,5% extrato de levedura; 1% triptona; 1% NaCl); 2YT: meio de cultura contendo 1% extrato de levedura; 1,6% triptona; 0,5% NaCl; 2YT/ON: meio de cultura 2YT sem adição de NaCl.

Em seguida, uma colônia foi coletada e inoculada em 5 mL de meio de cultura, seguida de incubação por 16 horas na temperatura ideal sob agitação. Dois mL de cultura saturada foram diluídos em 100 mL de meio fresco, e incubados novamente por cerca de 1 hora e 30 minutos sob agitação. A densidade ótica foi medida em espectrofotômetro a 600 nm. Quando a densidade ótica atingiu entre 0,4 e 0,6 o frasco de cultura foi transferido para banho de gelo. Adicionou-se 1 mL de MgCl<sub>2</sub> 1 M, seguido de incubação em banho de gelo por 15 minutos. A cultura foi, então, dividida em 4 tubos de centrifuga de 50 mL gelados, e centrifugada por 13 minutos a 2.600 g a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 20 mL de tampão RFI (100 mM KCl; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 30 mM acetato de potássio; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% glicerol) gelado, seguido de incubação em banho de gelo por 15 minutos. A amostra foi novamente centrifugada por 13 minutos a 2.600 g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 2 mL de tampão RFII (10 mM KCl; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM MOPS; 15% glicerol) gelado. A amostra foi



aliquotada a cada 50 µL em tubos de 1,5 mL em banho de gelo seco, e armazenada a -80 °C.

### **3.4 Extração de DNA genômico e para estudo da conservação dos genes entre diferentes cepas de *Leptospira***

Foi utilizado o método descrito por Maloy (1989) para obtenção do DNA das diferentes cepas de *Leptospira*. Para isso, 3 mL de cada cultura de *Leptospira* (espécies patogênicas: *L. interrogans* sorovares Icterohaemorrhagiae cepa RGA, Hardjo cepa Hardjoprajitno, Copenhageni cepa M 20, Pomona cepa Pomona e Canicola cepa Hound Utrech IV; *L. borgpetersenii* sorovares Castellonis cepa Castellon 3, Whitcombi cepa Whitcomb, Cynoptery cepa 3522C e Grippytyphosa cepa Moskva V, *L. santarosai* sorovar Shermani cepa 1342 K e *L. noguchii* sorovar Panamá cepa CZ 214; espécie não patogênica: *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc) de 7 dias de crescimento foram centrifugados a 11.500 g a temperatura ambiente por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 467 µL de tampão Tris-EDTA. Adicionou-se então 30 µL de 10% SDS e 60 µg de proteinase K, sendo homogeneizado com auxílio da pipeta e incubado a 37 °C por 1 hora. Aos tubos foi adicionado volume igual de fenol-clorofórmio 1:1, e homogeneizados com auxílio do vortex. Centrifugou-se a 11.500 g por 5 minutos, a temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi então transferida para tubos novos. Adicionou-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e em seguida 0,6 volume de isopropanol, e a amostra foi misturada gentilmente por inversão por 15 vezes, resultando na precipitação do DNA, sendo os tubos então incubados por 1 hora a -20 °C. Centrifugou-se a 11.500 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de etanol 70%, e novamente centrifugado a 11.500 g por 10 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante, e os tubos foram secos invertidos em papel absorvente. O DNA foi então ressuspenso em 50 µL de tampão Tris-EDTA, e estocado a -20 °C.

A concentração do DNA genômico de cada cepa foi determinado através do espectrofotômetro e de gel de agarose 1% corado com Gel Red™ (Biotium Inc, Hayward, CA, EUA).

Foram utilizados oligonucleotídeos (“forward”, F, e “reverse”, R) desenhados com auxílio do programa Generunner® (Hastings Software Inc, Hastings, NY, EUA)

para reação de PCR. A reação de PCR para avaliar a presença dos genes em espécies de *Leptospira* foi realizada utilizando-se PCR buffer; 0,2 mM dNTP; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada oligonucleotídeo (F e R); 2,5 U Taq polimerase; 100 ng de DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, para um volume final de 50 µL. As temperaturas de anelamento utilizadas foram determinadas de acordo com o programa Generunner® e subtraídas em 5 °C (Tabela 2).

**Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos empregada para amplificação dos genes nos diversos sorovares.**

Gene ID	Oligonucleotídeo sintético	TA	Inserto
LIC10411	F: 5' <u>CTCGAGG</u> AAAAATCTACTGAGGAAC 3'	54 °C	561 pb
	R: 5' <u>AAGCTT</u> GAGGATAAACTGTAAACTTG 3'		
LIC12891	F: 5' CTCGAGGAGGCATTGTTAGCTTTGTTG 3'	54 °C	533 pb
	R: 5' <u>AAGCTT</u> GAGAAAACATACTGAAC 3'		
LIC13305	F: 5' <u>CTCGAGT</u> GTTCTGACTGAAAAAGA 3'	58 °C	851 pb
	R: 5' <u>AAGCTT</u> TGTTTCGTTTTTGTGA 3'		
LIC10827	F: 5' <u>CTCGAGT</u> GTAAACAGTCAGATAACT 3'	49 °C	807 pb
	R: 5' <u>AAGCTT</u> TTACTGAACCTGAATTT 3'		
LIC11030	F: 5' <u>CTCGAGT</u> GTACAAACGAAAAAGAAGGT 3'	58 °C	997 pb
	R: 5' <u>AAGCTT</u> TTAGTTGCAAGGATTTGGA 3'		
LIC11469	F: 5' <u>CTCGAGC</u> CAATTTCTTTTCGATCCAAATC 3'	59 °C	513 pb
	R: 5' <u>AAGCTT</u> TCAATCCTCTACTGCAGCCC 3'		

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

### 3.5 Extração de RNA de culturas de *Leptospira spp.* e Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR)

Para o RT-PCR, o RNA total foi isolado utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. Alíquotas de 20 mL de cultura com cinco dias de crescimento foram centrifugadas 30 minutos a 11.500 g (4 °C). O sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspenso em 2 mL de *Trizol* (Invitrogen) e centrifugado 10 minutos a 11.500 g (4 °C). O sobrenadante foi transferido a um novo tubo, onde foi adicionado 400 µl de clorofórmio. A solução foi

homogeneizada através de agitação manual por 15 segundos, incubada 3 minutos a temperatura ambiente e, a seguir, centrifugada por 15 minutos a 11.500 g (4 °C). A fase aquosa (superior) foi então transferida a um novo tubo, onde foi adicionado 1 mL de isopropanol. A solução foi invertida seis vezes, incubada 10 minutos a temperatura ambiente e a seguir centrifugada 10 minutos a 11.500 g (4 °C). O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 2 mL de etanol 75%. A solução foi invertida duas vezes e centrifugada 5 minutos a 11.500 g (4 °C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a temperatura ambiente e, posteriormente, ressuspensão em 40 µl de água livre de RNase.

A qualidade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM (TBE) corado com Gel Red™ (Biotium). O RNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm.

Para o RT-PCR utilizou-se o kit “*SuperScript® III First Strand*” (Invitrogen). Uma alíquota de 2 µg de RNA foi tratada com *Dnase I Amplification Grade* (Invitrogen) e tampão fornecido pelo fabricante em um volume final de 20 µl. Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, foi adicionado EDTA 2,5 mM e aquecido a 65 °C por 10 minutos. Em cada fração foi adicionado random hexamers 25 ng (Invitrogen) e desoxirribonucleotídeos (dNTPs) 1 mM, incubada por 5 minutos a 65 °C e transferida ao gelo por pelo menos 1 minuto. Adicionou-se MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 10 mM, *RNase OUT* 40 U (Invitrogen), *SuperScript III RT* 200 U (Invitrogen) e tampão fornecido pelo fabricante para um volume final de 22 µl. A reação foi incubada em termociclador a 25 °C por 10 minutos, 50 °C por 50 minutos, 85 °C por 5 minutos e em seguida no gelo. As amostras foram então tratadas com *RNase H* 1 U (Invitrogen) a 37 °C por 20 minutos e armazenadas a -20 °C.

Um décimo do produto da transcrição reversa foi empregado como molde para a reação de PCR. Como controle da qualidade e quantidade de transcritos foi elaborado um par de oligonucleotídeos para o RNAr 16S (5'CAAGTCAAGCGGAGTAGCAATACTCAGC3'; 5'GATGGCAACATAAGGTGAGGGTTGC 3', TA 63 °C, inserto de 1.050 pb).

### 3.6 Clonagem

Os genes LIC10411, LIC12891, LIC13305, LIC10827, LIC11030 e LIC11469 foram amplificados através de PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans*

sorovar Copenhageni cepa M20, utilizando as mesmas condições da PCR realizada para o estudo da conservação dos genes. Os insertos foram amplificados sem a sequência do peptídeo sinal e foram adicionados os sítios de restrição para as enzimas *Xho*II/*Hind*III. A amplificação e o tamanho das sequências de interesse foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA) corado com Gel Red™.

Os insertos de interesse foram purificados do gel de agarose através do kit “GFXPCR DNA and gel band purification” (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) e os produtos obtidos foram quantificados em espectrofotômetro.

Os insertos de DNA obtidos foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega). A reação de ligação foi realizada segundo a reação padrão estabelecida pelo fabricante. Os produtos de ligação foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  previamente tornadas competentes pelo método descrito anteriormente na seção 3.3.

Para a transformação foram utilizados 50 ng do produto de ligação para 50  $\mu$ L de bactéria competente DH5 $\alpha$  (Invitrogen). Incubou-se por 30 minutos em banho de gelo e depois submeteu-se a amostra a um choque térmico, por 2 minutos a 42 °C. Retornou-se ao banho de gelo por mais 5 minutos e acrescentou-se 300  $\mu$ L de meio de cultura Luria Bertani – LB (0,5% extrato de levedura; 1% triptona; 1% NaCl). Incubou-se a 37 °C, por 45 minutos, sob agitação. A amostra foi plaqueada em LB contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, 100 mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo) e 50 mg/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo). Incubou-se a 37 °C por uma 16 horas. As colônias positivas foram escolhidas por seleção azul/branco, inoculadas em 5 mL de LB contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C, sob agitação, por 16 horas.

Para obtenção do DNA plasmidial (pGEM-T Easy/inserto) utilizou-se o kit “Plasmid prepmini spin” (GE Healthcare) seguindo as orientações do fabricante. Foi verificada a presença de insertos nos plasmídeos obtidos, através de eletroforese em gel de agarose, após a digestão dos mesmos com as enzimas de restrição *Xho*II/*Hind*III.

Os insertos clonados foram removidos dos plasmídios recombinantes (pGEM-T Easy/inserto) por digestão com as enzimas de restrição conforme recomendação do fabricante. O vetor de expressão pAE (pRSETa, modificado por Ramos et al., 2004) foi digerido separadamente com as mesmas enzimas de restrição utilizadas

para obtenção dos insertos. Após digestão, ambos os insertos e o vetor de expressão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e posteriormente purificados com auxílio do kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare).

A ligação dos insertos ao vetor foi realizada em uma reação contendo inserto:vetor em uma proporção 5:1 em massa de DNA e 5U de T4 DNA ligase (GE Healthcare) conforme recomendação do fabricante. Foi realizada uma reação controle onde omitiu-se o inserto.

Bactérias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) foram transformadas com os produtos de ligação e com os controles negativos, plaqueadas em LB/Amp e incubadas a 37 °C por 16 horas.

As colônias positivas e negativas selecionadas foram inoculadas em 5 mL de LB contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C, sob agitação, por 16 horas. Para a seleção dos clones positivos, 300  $\mu$ L de cada inóculo foram centrifugados a 11.500 g, por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 50  $\mu$ L de água deionizada. Adicionou-se 20  $\mu$ L de Ficoll dye 10X e 28  $\mu$ L de solução fenol-clorofórmio 1:1. Homogeneizou-se a amostra com o auxílio do vortex. A amostra foi centrifugada a 11.500 g, por 3 minutos e a fase superior foi analisada por eletroforese de gel de agarose 1%.

A obtenção do DNA plasmidial (pAE/inserto) e a verificação da presença dos insertos foi feita da mesma maneira descrita para o vetor pGEM-T.

### **3.7 Sequenciamento dos clones**

Os clones positivos foram sequenciados utilizando os oligonucleotídeos 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' e 5' TATGCTAGTTATTGCTCAG 3', que se anelam ao vetor pAE (RAMOS et al., 2004) e o sequenciador automático *ABI PRISM(R) 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), empregando o método da terminação da cadeia (SANGER et al., 1977). Este método emprega o uso de 2', 3'-didesoxirribonucleotídeos (ddNTPs) marcados por fluoróforos que interrompem a amplificação aleatoriamente e possibilitam a leitura automatizada através de um feixe de laser gerando um cromatograma. Conforme recomendação da Applied Biosystems, a reação de amplificação dos fragmentos a serem sequenciados foi realizada num volume final de 20  $\mu$ l contendo DNA molde

500 ng, 3,2 pmoles de oligonucleotídeo e 2 µl do tampão *BigDye*® (Applied Biosystems) que contém: ddNTPs marcados com corantes fluorescentes específicos, dNTPs e Taq DNA polimerase. A reação foi realizada em termociclador seguindo a rotina de 40 ciclos de 94 °C por 10 segundos; 52 °C por 20 segundos; 60 °C por 4 minutos. A seguir, a mistura foi precipitada com isopropanol 75% e centrifugada 50 minutos a 11.500 g a temperatura ambiente. O precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, seco a vácuo em centrifuga e ressuspensão para aplicação em 15 µl de formamida HiDi (Applied Biosystems). Os cromatogramas obtidos foram analisados com o auxílio dos programas públicos CHROMAS e BLAST 2 (ALTSCHUL et al., 1990; ALTSCHUL et al., 1997).

### **3.8 Expressão das proteínas recombinantes**

Bactérias competentes *E. coli* BL21 SI (Invitrogen) foram transformadas com o plasmídeo recombinante e cultivadas em meio 2YT/ON (1% extrato de levedura; 1,6% triptona; sem adição de NaCl) contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 30 °C, sob agitação, por 16 horas. Após este período, as culturas saturadas foram diluídas (1:25) em um novo meio e incubadas até atingir uma densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) entre 0,6 e 0,8. A indução foi realizada adicionando-se 3, 30 e 300 mM de NaCl e incubando as culturas, novamente, a mesma temperatura por um período de 3 horas. Para as bactérias competentes *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS, o procedimento foi semelhante, porém o meio utilizado foi o LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol. A temperatura de incubação foi de 37 °C e a indução foi realizada adicionando-se 0,01; 0,1 e 1 mM de IPTG e incubando as culturas, novamente, a mesma temperatura por um período de 3 horas. A seguir as bactérias foram centrifugadas a 3.200 g, por 15 minutos a 4 °C e os sedimentos ressuspensos em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 200 µg/mL lisozima; 2 mM PMSF (fenilmetilsulfonilflúor) e 1% Triton X-100). As bactérias foram então lisadas em banho de gelo por sonicação e centrifugadas novamente. Os sedimentos formados foram ressuspensos em PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM  $Na_2HPO_4$ ; 2 mM  $KH_2PO_4$ ) e 8 M ureia, e alíquotas do sobrenadante da sonicação e do sedimento ressuspensão foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% contendo SDS (PAGE/SDS 15%).

### 3.9 Purificação e diálise das proteínas recombinantes

A purificação da proteína recombinante rLIC11030 foi realizada empregando 250 mL de cultura de *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS, cujo sedimento formado após sonicação e centrifugação foi lavado duas vezes com tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 1 M ureia; 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol e 1% Triton X-100. Ao final das lavagens, o sedimento foi ressuspenso em 60 mL de tampão de desnaturação (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 8 M ureia e 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol). A amostra então foi diluída por gotejamento (fluxo de 1 mL por minuto) em 2 L de tampão de *refolding* contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,0 e 500 mM NaCl, sob agitação. A resina “Chelating Sepharose” (GE Healthcare) previamente carregada com  $\text{Ni}^{2+}$  foi equilibrada com tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl e 5 mM imidazol, e carregada com os 2 L de amostra diluída no tampão de *refolding*. Após 4 lavagens (30 mL) com o tampão descrito acima, porém com concentrações crescentes de imidazol de 5 mM, 20 mM, 40 mM e 60 mM respectivamente, a proteína foi eluída com a concentração de 1 M de imidazol.

A purificação da proteína recombinante rLIC11469 foi realizada empregando 250 mL de cultura de *E. coli* BL21 (SI), cujo sedimento formado após sonicação e centrifugação foi solubilizado em tampão contendo 6 M guanidina; 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl e 5 mM imidazol, e a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade a metal, utilizando o sistema ÄKTAPrime plus (GE Healthcare) e coluna HiTrap™ contendo resina “Chelating HP” (GE Healthcare) carregada com  $\text{Ni}^{2+}$  e equilibrada com o tampão utilizado para solubilizar a proteína. Após adsorção de 50 mL da proteína solubilizada, a coluna foi lavada com tampão de renaturação, através de um gradiente de remoção de ureia (de 6 a 0 M) e a eluição foi realizada também através de um gradiente com tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl e 500 mM Imidazol.

As frações de todas as etapas da purificação foram coletadas e analisadas em PAGE/SDS 15%. As alíquotas que continham a proteína recombinante rLIC11030 foram unidas e dialisadas contra PBS e 0,1 mM PMSF a 4 °C por 16 horas. As alíquotas que continham a proteína recombinante rLIC11469 foram unidas e dialisadas contra tampão contendo 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM NaCl e 0,01% glicina a 4 °C por 16 horas. Foram realizadas quatro trocas do tampão de diálise, sendo que para a rLIC11469, a última troca foi feita utilizando tampão contendo 10

mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM NaCl e 0,01% glicina. Quando necessário, a proteína recombinante, foi concentrada utilizando o método de liofilização, em um liofilizador ModulyoD – 115 (Thermo Electron Corporation - Milford, Massachusetts, EUA). A concentração das proteínas recombinantes foi estimada em PAGE/SDS, através da comparação destas com concentrações pré-estabelecidas de albumina (BSA – *Bovine Serum Albumin*), e auxílio do programa Gel Quantifier Image Analysis (GelQuant), versão 2.7.0), um software de análise de imagem de eletroforese de ácidos nucléicos ou proteínas, para quantificação das bandas de acordo com o padrão utilizado (BSA), em um fotodocumentador MiniBIS Pro (DNR Imaging System, Ltda).

### 3.10 Espectroscopia circular

As amostras de proteínas foram dialisadas contra tampão PBS para rLIC11030 e 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 50 mM NaCl para rLIC11469. Os espectros de CD foram expressos em termos de elipcidade molar residual:

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

onde  $\Phi$  é elipcidade,  $\mathbf{C}$  é a concentração da proteína e  $\mathbf{I}$  é o caminho ótico (Kelly *et al.*, 2005).

As medições de espectroscopia circular foram feitas a 20°C em um Espectropolarímetro Jasco J-810 (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japão) equipado com uma unidade Peltier para controle de temperatura. O espectro foi medido usando uma célula de 1 mm a intervalos de 0,5 nm, e apresentado como uma média de cinco escaneamentos de 193 a 260 nm para rLIC11469 e de 185 a 260 nm para rLIC11030.

### 3.11 Imunização

Dez camundongos BALB/c fêmeas (idade de 6 a 8 semanas) foram imunizados subcutaneamente com 10 µg de cada proteína recombinante ou PBS (controle negativo) em suspensão contendo *Alhydrogel* (2% Al(OH)<sub>3</sub>, Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca) como adjuvante na concentração final de 12%, por via subcutânea. Foram realizadas três imunizações com intervalos de 15 dias. Os animais foram sangrados via plexo retro-orbital 15 dias após a terceira dose



de imunização. O sangue coletado foi incubado a 4 °C por 16 horas e foi centrifugado por 5 minutos a 800 g. O soro foi cuidadosamente coletado e armazenado a -20 °C.

### 3.12 Detecção de anticorpos por ELISA

#### 3.12.1 Detecção de anticorpos IgG por ELISA após imunização de camundongos com as proteínas recombinantes

A detecção de anticorpos IgG anti-rLIC11030 e anti-rLIC11469 após as imunizações foi feita por ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). A concentração das proteínas recombinantes foi ajustada para 5 µg/mL em tampão carbonato 0,05 M pH 9,6 e em seguida foram adicionados 50 µL por poço em uma placa de 96 poços (Costar® High binding, Corning Incorporated, EUA). Incubou-se a placa a temperatura ambiente por 16 horas. Após incubação, as placas foram lavadas com PBS/Tween 0,05%. A placa foi então incubada com solução de bloqueio (PBS/Leite desnatado 10%), 200 µL por poço, durante 2 horas a temperatura de 37 °C. Foi feita uma diluição seriada de 1:200 a 1:409.600 dos soros de camundongos em solução de bloqueio acrescida de 25% de extrato de *E. coli*. Incubou-se estes soros por 1 hora para que ocorresse a adsorção dos anticorpos inespecíficos. Em seguida, adicionou-se 50 µL das amostras adsorvidas por poço e incubou-se a temperatura ambiente por 1 hora. A placa foi lavada e incubada por 1 hora, a temperatura ambiente, com 50 µL por poço de solução de bloqueio contendo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich Corporate, St Louis, MO, EUA) na diluição 1:5.000. A reação enzimática foi revelada pela adição de 1 mg/mL de OPD ( $\delta$ -phenylenediamina, Sigma) diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 0,03% (vol/vol) de peróxido de hidrogênio (100 µL por poço). Após 15 minutos de incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N.

A intensidade da reação foi analisada em um espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences – GE Healthcare), no comprimento de onda de 492 nm. Os valores de DO<sub>492nm</sub> obtidos foram subtraídos do valor do “branco” da placa (poço com antígeno e sem incubação com soro dos camundongos). O título

individual foi determinado como sendo a maior diluição do soro com valor da  $DO_{492nm}$  maior do que 0,1.

### 3.12.2 Detecção de anticorpos IgG e IgM em soro de pacientes diagnosticados com leptospirose por ELISA

A detecção de anticorpos IgG e IgM anti-proteínas recombinantes no soro destes indivíduos foi feita por ELISA de maneira semelhante ao experimento de detecção de anticorpos de camundongos, introduzindo-se algumas modificações tais como: a diluição única dos soros de 1:200, os anticorpos secundários utilizados foram anti-IgG e anti-IgM humanos conjugados a peroxidase (Sigma) na diluição 1:5.000. A revelação da placa ocorreu de forma semelhante, assim como a leitura dos dados. Para adsorção prévia de anticorpos inespecíficos foi utilizada a concentração do extrato bacteriano de 25%.

Foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentaram valores maiores do que o estabelecido pelo *cutoff*. Os valores de *cutoff* foram calculados a partir de valores obtidos para oito indivíduos saudáveis. A fórmula utilizada para o cálculo do *cutoff* foi a média da DO dos indivíduos normais mais três vezes o desvio padrão desta média.

### 3.13 Obtenção do extrato proteico de *Leptospira spp.*

Culturas de leptospiros (cepas mencionadas na seção 3.4) de sete a dez dias foram centrifugadas 20 minutos a 8.000 g (4 °C) e o sedimento lavado três vezes com tampão PBS acrescido de 5 mM  $MgCl_2$ . Uma fração do sedimento bacteriano foi ressuspensa em PBS acrescido de SDS 10% em um volume 100 vezes inferior ao volume da cultura, sendo esta alíquota empregada como extrato total.

### 3.14 Ensaio de *Immunoblotting*

As proteínas a serem avaliadas foram separadas por PAGE/SDS e transferidas para membrana de nitrocelulose “Hybond-ECL” (GE Healthcare) em sistema semi-úmido (GE Healthcare) por 1 hora a 0,8 mA por  $cm^2$  em Tris-Glicina acrescido de 1,85% de SDS (tampão de transferência). A eficiência da transferência

foi avaliada por coloração de *Ponceau S* (Sigma). As proteínas foram descoradas com PBS/Tween 0,05% sob agitação e a membrana foi então incubada com solução de bloqueio (PBS/Leite desnatado 10%) durante uma noite a temperatura de 4 °C. Lavou-se a membrana por 15 minutos com PBS/Tween 0,05%, e logo após a mesma foi incubada com anticorpo monoclonal de camundongo anti-poli-histidina (Sigma) na diluição 1:3.000 ou anticorpo policlonal de camundongo anti-rLIC11469 ou anti-rLIC11030 na diluição 1:1.000 em PBS/Leite desnatado 10%, por 2 horas a temperatura ambiente (sob agitação). A membrana foi lavada por 15 minutos com PBS/Tween 0,05%, e incubada com PBS/Tween 0,05% contendo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:5.000, por 1 hora a temperatura ambiente (sob agitação). Lavou-se novamente a membrana por 15 minutos com PBS/Tween 0,05%, e as frações detectadas utilizando kit ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) ou 3,3- Diaminobenzidina tetra-hidroclorido diidrato (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Filmes de raio-X T-MAT G/RA (Kodak, Cedex, França) foram expostos à membrana por tempos curtos (1 a 10 minutos) e em seguida revelados.

### **3.15 Estudos de localização celular**

#### **3.15.1 Imunofluorescência em fase líquida**

Alíquotas de 2,5 mL de cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 com sete dias de crescimento foram centrifugadas 15 minutos a 11.500 g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes com 2,5 mL de tampão PBS<sub>low</sub> (NaCl 50 mM). O sedimento foi ressuspensão em 200 µl de tampão PBS<sub>low</sub> contendo 2 µg de iodeto de propídio (Sigma) e incubado 45 minutos a 37 °C no escuro. As células foram centrifugadas 15 minutos a 11.500 g e lavadas duas vezes com 1 mL de tampão PBS<sub>low</sub>. O sedimento foi ressuspensão em 200 µl de tampão PBS<sub>low</sub> gelado contendo anticorpo policlonal específico para cada proteína recombinante teste (diluição 1:50) e incubado 30 minutos em gelo. As células foram centrifugadas 15 minutos a 11.500 g e lavadas duas vezes com 1 mL de tampão PBS<sub>low</sub>. O sedimento foi ressuspensão em 100 µl de tampão PBS<sub>low</sub> gelado contendo com anticorpo produzido em cabra anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma, diluição 1:50) e incubado 30 minutos em

gelo no escuro. As células foram centrifugadas 15 minutos a 11.500 g e lavadas duas vezes com 1 mL de tampão PBS (NaCl 50 mM). O sedimento foi ressuspensão em 50 µl de tampão PBS<sub>low</sub> gelado acrescido de uma gota do reagente *ProLong Gold antifade* (Invitrogen). Imagens foram captadas em microscópio de imunofluorescência confocal LSM 510 META (Carl Zeiss Inc., Alemanha) do Departamento de Parasitologia do Instituto Butantan (São Paulo, SP). Foi empregado aumento de 600 vezes (FITC, excitação 488 nm, emissão 500-550 nm; iodeto de propídio (Sigma), excitação 543 nm, emissão 612-619 nm).

### 3.15.2 Ensaio de acessibilidade com Proteinase K

A digestão enzimática foi realizada como descrito por Pinne e Haake (PINNE e HAAKE, 2009), com algumas modificações. Brevemente, 5 mL de cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 crescidas a 28 °C foram centrifugados a 3.200 g por 10 minutos a temperatura ambiente e gentilmente lavados com PBS contendo 5 mM MgCl<sub>2</sub>. As leptospiros foram lavadas e ressuspensas em tampão de proteólise contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM CaCl<sub>2</sub> com proteinase K (PK) (Sigma) na concentração de 25 µg/mL. As alíquotas foram incubadas a 37 °C e a 70 rpm, e coletadas nos tempos 0, 1, 2, 4 e 6 horas, sendo adicionados 2 mM de PMSF para interromper a atividade da PK. As alíquotas foram em seguida centrifugadas a 11.500 g por 5 minutos, lavadas duas vezes com PBS contendo 5 mM MgCl<sub>2</sub> e ressuspensas em PBS para análise de *imunoblotting* utilizando anticorpos policlonais produzidos em camundongo específicos contra rLIC11469, rLIC11030, e GroEL.

### 3.16 Ensaio de adesão a componentes da matriz extracelular e componentes do soro humano

Componentes de matriz extracelular (1 µg de laminina, colágeno I e IV, fibronectina plasmática e celular, ECM gel, BSA e fetuína - Sigma), e componentes do soro humano (1 µg de plasminogênio e fator H - Calbiochem, Merck, e fibrinogênio - Sigma), diluídos em PBS, foram adsorvidos em placas de microdiluição por três horas a 37 °C.

As placas foram lavadas três vezes com PBS/Tween 0,05% e bloqueadas com tampão PBS/Leite desnatado 10% por uma hora a 37 °C e em seguida por 16 horas a 4 °C. A solução de bloqueio foi descartada e às placas foram adicionados 100 µl/poço de solução tampão PBS contendo 1 µg proteína recombinante purificada. As placas foram incubadas por uma hora e 30 minutos a 37 °C e, em seguida, lavadas seis vezes com PBS/Tween 0,05%. Foram adicionados 100 µl/poço de PBS contendo anticorpo policlonal específico para cada proteína recombinante teste (diluição na qual absorbância a 492 nm foi igual a 1,0) e incubada por uma hora a 37 °C. As placas foram lavadas três vezes com PBS/Tween 0,05%. A seguir, foram adicionados 100 µl/poço de PBS contendo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma, diluição 1:5.000) por uma hora a 37 °C. As placas foram lavadas três vezes com PBS/Tween 0,05%. A reação foi revelada utilizando o substrato OPD como descrito anteriormente.

Para cada proteína teste, quatro poços foram adsorvidos com determinado componente de matriz extracelular ou componente do soro humano, sendo que a um deles não foi adicionado proteína recombinante a fim de mensurar a reatividade basal (controle branco) (BARBOSA et al., 2006; CAMERON, 2003).

### **3.17 Tratamento da laminina com metaperiodato**

Laminina (0,5 µg) em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) foi tratada com concentrações crescentes de metaperiodato de sódio (0 a 100 mM - Sigma) por uma hora a temperatura ambiente no escuro. A adesão das proteínas recombinantes foi avaliada como descrito anteriormente.

### **3.18 Curvas de dose-resposta**

Placas de ELISA foram incubadas com com 100 µl/poço de tampão PBS contendo 1 µg de plasminogênio ou laminina por 16 horas a 4 °C. As placas foram então bloqueadas com tampão PBS/Leite desnatado 10% por uma hora a 37 °C e foram adicionadas concentrações crescentes de proteínas recombinantes (0-10 µM) em tampão PBS (100 µl/poço). As proteínas ligadas foram detectadas com anti-soro produzido contra cada proteína na diluição 1:1.000, incubado por uma hora a 37 °C.

A seguir, foram adicionados 100 µl/poço de PBS contendo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma, diluição 1:5.000) por uma hora a 37 °C. A reação foi revelada utilizando o substrato OPD como descrito anteriormente. Os dados do teste de ELISA foram utilizados para calcular a constante de dissociação (KD) de acordo com o método descrito por Pathirana et al. (PATHIRANA et al., 2006) e Lin et al. (LIN et al., 2009b), com base na equação:  $A = \frac{[proteína] A_{max}}{([Proteína] + KD)}$ , onde A é a absorbância a uma determinada concentração de proteína,  $A_{max}$  é a absorbância máxima obtida (onde a reação atinge o equilíbrio), [proteína] é a concentração de proteína e KD é a constante de dissociação do equilíbrio para uma dada absorbância em uma dada concentração de proteína.

### **3.19 Ensaio de atividade enzimática da plasmina**

O ensaio foi feito de acordo com o método descrito por Vieira et al. (2009). Placas de ELISA foram incubadas com 100 µl/poço de solução tampão PBS contendo 1 µg de proteína recombinante ou BSA por 16 horas a 4 °C. As placas foram então lavadas uma vez com PBS/Tween 0,05% e bloqueadas com tampão PBS/Leite desnatado 10% por 2 horas a 37 °C. Foram adicionados 100 µl/poço de solução tampão PBS contendo 1 µg de plasminogênio, seguido por incubação por 2 horas a 37 °C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS/Tween 0,05% e em seguida foram adicionados 4 ng/poço de ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA – Sigma). Subsequentemente, 100 µl/poço de substrato específico para a plasmina “D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride” (Sigma) foram adicionados na concentração final de 0,4 mM em solução tampão PBS. As placas foram então incubadas por 16 horas a 37 °C e o substrato foi mensurado através de leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 405 nm (VIEIRA et al., 2009).

### **3.20 Interferência da laminina na ligação do plasminogênio à rLIC11469**

Placas de ELISA foram incubadas com 100 µl/poço de solução tampão PBS contendo 1 µg da proteína recombinante rLIC11469 por 16 horas a 4 °C. Em

seguida, foram lavadas uma vez com PBS/Tween 0,05% e bloqueadas com PBS/Leite desnatado 10% por 2 horas a 37 °C. As placas foram então incubadas por 2 horas a 37 °C com 1 µg de plasminogênio juntamente com concentrações crescentes de laminina (de 0 a 10 µg), ou com 1 µg de laminina juntamente com concentrações crescentes de plasminogênio (de 0 a 10 µg). Após 4 lavagens com PBS/Tween 0,05% a ligação do plasminogênio ou da laminina foi quantificada através do uso de anticorpos específicos contra plasminogênio (1:4.000, Calbiochem) ou laminina (1:1.000, Sigma).

### **3.21 Inibição da ligação de leptospiros vivos à laminina ou plasminogênio pela rLIC11469**

Como descrito por Barbosa et al. (2006), placas de ELISA foram incubadas com 100 µl/poço de solução tampão PBS contendo 1 µg de laminina ou plasminogênio por 16 horas a 4 °C. Em seguida, foram lavadas uma vez com PBS/Tween 0,05% e bloqueadas com PBS/Leite desnatado 10% por 2 horas a 37 °C. A solução de bloqueio foi descartada e as placas incubadas por 90 minutos à 37 °C com concentrações crescentes de rLIC11469 (de 0 a 7,5 µg). Após três lavagens com PBS/Tween 0,05%, foram adicionados 100 µl/poço de  $4 \times 10^7$  bactérias vivas, de poucas passagens em cultura, *L. interrogans* sorovar Copenhageni (cepa M20), e incubou-se por 90 minutos a 37 °C. As placas foram lavadas e foram adicionados anticorpos policlonais anti-LipL32 (1:4.000) produzidos em camundongo, para quantificar de forma indireta as leptospiros ligadas, devido ao fato de ser a LipL32 uma proteína majoritária de membrana externa de *Leptospira* (HAAKE et al., 2000); em seguida adicionou-se anticorpos conjugados à peroxidase anti-mouse IgG (BARBOSA et al., 2006). A reação foi revelada utilizando o substrato OPD como descrito anteriormente.

### **3.22 Imunização de hamsters para ensaio de imunoproteção**

Os ensaios de imunoproteção foram realizados no laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da USP. Grupos de dez ou oito hamsters fêmeas (experimentos de desafio rLIC11469), ou grupos de dez hamsters machos

(experimentos de desafio rLIC11030) recém-desmamados (80 a 120 g) foram imunizados subcutaneamente no dorso com 50 µg de proteína recombinante, bacterina ou PBS (controle negativo) em suspensão contendo *Alhydrogel* (2% Al(OH)<sub>3</sub>, Brenntag Biosector) na concentração final de 12% como adjuvante. Foram realizadas duas imunizações com intervalos de 15 dias. Dois animais foram sangrados via punção cardíaca 15 dias após cada imunização. Os soros foram avaliados por ELISA semelhante ao descrito para soro hiperimune produzido em camundongo. Brevemente, após a diluição do soro na placa de microdiluição, incubava-se com anticorpo de coelho anti- IgG de hamster (Sigma, diluição 1:5.000) e a seguir, com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma, diluição 1:5.000). A reação foi revelada com OPD como descrito anteriormente.

A bacterina foi preparada conforme descrito por Silva et al. (2007). Cultura de *L. interrogans* sorovar Pomona (cepa LPF) virulenta recém isolada de animal infectado teve sua densidade celular estimada através de contagem em câmara de Petroff-Hausser em microscópio de campo escuro. O número de bactérias presentes no campo central da câmara foi contado e em seguida, utilizou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Número de células por mL} = \text{N}^{\circ} \text{ de células contadas} \times \text{Diluição} \times 50.000$$

Após a contagem, a dose para inóculo foi ajustada para  $10^9$  leptospiras / animal. A cultura foi então centrifugada 20 minutos a 8.000 g (temperatura ambiente) e o sedimento lavado duas vezes com tampão PBS acrescido de 5 mM MgCl<sub>2</sub>. O sedimento foi ressuspenso em PBS e incubado 20 minutos a 56 °C para inativação das bactérias. Alíquotas foram armazenadas a -20 °C.

### 3.22.1 Desafio

No 30º dia após a 1ª imunização, os animais foram infectados por inoculação intraperitoneal de 200 µl de cultura de *L. interrogans* sorovar Pomona (cepa LPF) virulenta recém isolada.

Para cálculo da DI<sub>50</sub>, leptospiras virulentas na fase log (7 a 10 dias de crescimento) são contadas em câmara de Petroff-Hausser, sendo em seguida inoculadas em hamsters (1 mL/animal), em diluições seriadas de 10 vezes, iniciando em  $10^9$  até  $10^0$  leptospiras/mL. São inoculados cerca de 4 animais por diluição



utilizada. Após inoculação, os animais são observados duas vezes por dia, por 21-28 dias, e no fim do período de observação, é considerada DL<sub>50</sub> a última diluição onde houve morte de 50% dos animais. Por exemplo, se a DL<sub>50</sub> equivaler a diluição de 10<sup>5</sup> leptospiras/mL, esse valor é considerado para o desafio, sendo as leptospiras recém isoladas contadas, e o volume ajustado para 250 µl/animal.

Através de contagem em câmara de Petroff-Hausser em microscópio de campo escuro, a dose correspondente a DL<sub>50</sub> foi ajustada para cerca de 1,8 x 10<sup>6</sup> células / animal, nos experimentos de desafio da rLIC11030, e 2 x 10<sup>5</sup> células / animal, nos experimentos de desafio da rLIC11469. Os animais foram observados por 21 dias e os sobreviventes foram sacrificados. Foi coletado sangue via punção cardíaca e soro foi avaliado por MAT. Os rins dos animais sobreviventes foram coletados, macerados, suspensos em solução salina (diluição 1:10 e 1:100) e cultivados em meio EMJH modificado semi-sólido a 28 °C para avaliação da presença de leptospiras após 6 semanas de observação. A análise de significância estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism versão 3.00, utilizando o método Kaplan–Meier (KAPLAN e MEIER, 1958). O valor de *P* de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

### 3.22.2 Teste de microaglutinação (MAT)

O ensaio de MAT foi realizado no laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da USP conforme descrito por Faine et al. (FAINE et al., 1999). Foi empregada uma bateria de 25 sorovares de *Leptospira* spp como antígeno: Whitcombi, Andamana, Australis, Autumnalis, Bataviae, Butembo, Canicola, Castellonis, Sentot, Copenhageni, Cynopteri, Bratislava, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Shermani, Tarassovi, Hardjo (hardjoprajitno), Hardjo (harjobovis) e Wolffi. Todas as linhagens são mantidas em meio EMJH modificado a 28 °C. Um teste é determinado positivo quando há um aumento de pelo menos quatro vezes na microaglutinação de amostras de soro pareadas. O sorovar que apresentar um título de aglutinação de 50% na maior diluição é considerado o provável sorotipo predominante. O teste é considerado negativo se não houver microaglutinação com nenhum dos 22 sorovares listados acima.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise das características das proteínas selecionadas

De acordo com o programa LipoP (JUNCKER et al., 2003), todas as proteínas selecionadas possuem sítio de clivagem e devem ser encaminhadas a membrana da leptospira. As sequências SpII indicam lipoproteínas, pois essas são clivadas pela enzima peptidase sinal II (SPase II), enquanto Spl indicam proteínas preditas (citoplasmáticas ou transmembranas), clivadas pela peptidase sinal I (SPase I). Este programa também é uma ferramenta para analisar a presença de uma sequência consenso denominada lipobox, na qual, a presença de um resíduo de cisteína indica que a proteína é lipídada.

Adicionalmente, segundo os programas PSORT e BLAST (ALTSCHUL et al., 1990; NAKAI e KANEHISA, 1991), LIC10411 codifica uma predita proteína de membrana, ao passo que todos os outros genes escolhidos codificam lipoproteínas preditas da classe das proteínas hipotéticas.

Até o momento, três espécies de *Leptospira spp* foram sequenciadas: *L. interrogans* sorovar Lai (REN et al., 2003) e sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004a; NASCIMENTO et al., 2004b), *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis (BULACH et al., 2006) e *L. biflexa* sorovar Patoc (PICARDEAU et al., 2008). Os 6 genes estudados foram selecionados de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e através da análise comparativa das sequências de aminoácidos preditas, verificou-se que todas as proteínas são altamente conservadas em *Leptospira spp* e não possuem função conhecida (Tabela 2). Todas possuem alta similaridade com o gene correspondente em *L. interrogans* sorovar Lai, três delas em *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis (LIC10411, LIC13305 e LIC11469) e apenas LIC11469 está presente na espécie saprofítica *L. biflexa*.

Os genes LIC10411, LIC13305, LIC11469 e LIC10827 não possuem domínios conservados, ao passo que em LIC12891 um provável domínio “*Haemagglutinin Putative Immunoglobulin*” - He\_PIG (encontrado em várias hemaglutininas e proteínas de superfície celular) está presente entre os aminoácidos 81 e 124, de acordo com o programa PFAM (SONNHAMMER; EDDY; DURBIN, 1997). No caso da LIC11030, um provável domínio “*Parallel Beta-helix repeats*” - PbH1 (proteínas

contendo essas repetições comumente são enzimas com substratos polissacarídicos), constituído pelos aminoácidos TYENKIENNTIYRNRVYGVIRP, está presente entre os aminoácidos 238 e 259, segundo os programas PFAM (SONNHAMMER; EDDY; DURBIN, 1997) e SMART (SCHULTZ et al., 1998). De acordo com estes programas, proteínas contendo essa sequência comumente são enzimas que utilizam polissacarídeos como substrato.

A tabela 3 mostra resumidamente a análise por bioinformática dos 6 genes selecionados no presente estudo.

**Tabela 3 - Resumo da análise por bioinformática.**

Gene ID	Descrição	Sítio de clivagem	Domínio conservado	Similaridade com outras espécies já sequenciadas
LIC10411	Proteína hipotética	22-23	-	<i>L. interrogans</i> 100% <i>L. borgpetersenii</i> 83% <i>L. biflexa</i> : ausente
LIC12891	Lipoproteína	18-19	He_PIG	<i>L. interrogans</i> 99% <i>L. biflexa</i> : ausente
LIC13305	Lipoproteína	21-22	-	<i>L. interrogans</i> 99% <i>L. borgpetersenii</i> 85% <i>L. biflexa</i> : ausente
LIC11030	Lipoproteína	17-18	PbH1	<i>L. interrogans</i> 99% <i>L. biflexa</i> : ausente
LIC11469	Lipoproteína	19-20	-	<i>L. interrogans</i> 99% <i>L. borgpetersenii</i> 82% <i>L. biflexa</i> : 70%
LIC10827	Lipoproteína	19-20	-	<i>L. interrogans</i> 98% <i>L. biflexa</i> : ausente

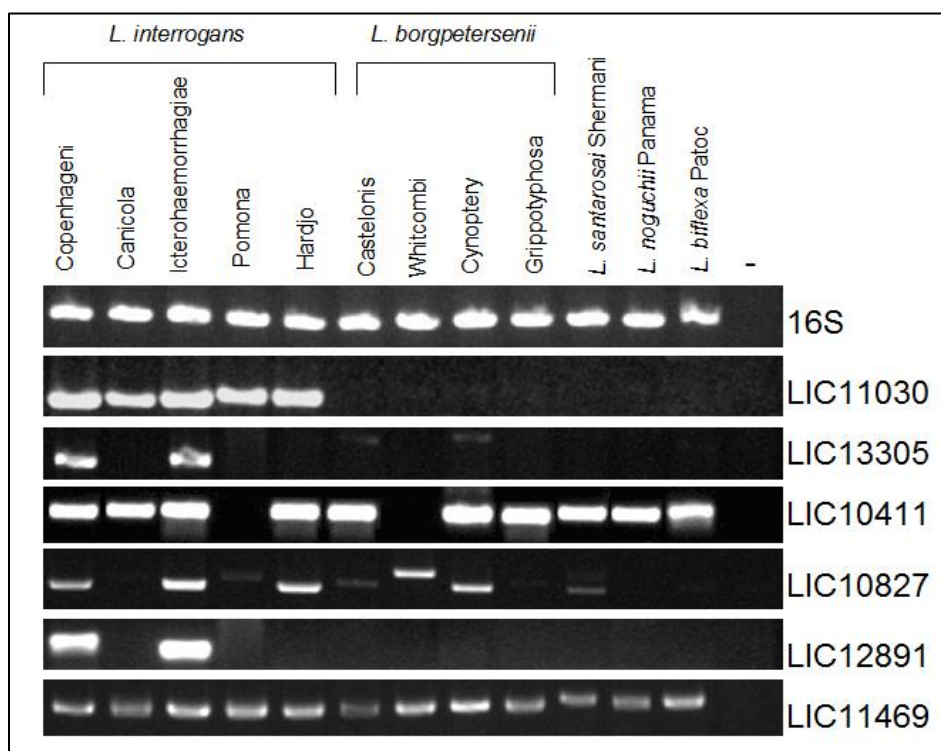
NOTAS: Gene ID: identificação do gene no genoma *L. interrogans* sorovar Copenhageni; Abreviaturas: *L. interrogans*: *L. interrogans* sorovar Lai; *L. borgpetersenii*: *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis; *L. biflexa*: *L. biflexa* sorovar Patoc.

## 4.2 Análise da conservação dos genes entre os diversos sorovares de *Leptospira*

Devido à grande diversidade da composição antigênica entre os diversos sorovares de *Leptospira* (LEVETT, 2001), a análise de conservação é um fator importante a ser avaliado quando se trata de um antígeno em potencial. Para este fim, foi realizada uma extração de DNA genômico de *Leptospira spp.* e estudo da conservação dos genes LIC10411, LIC12891, LIC13305, LIC11030, LIC11469 e LIC10827, através de PCR, empregando oligonucleotídeos desenhados com base no gene correspondente em *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Figura 5).

Após a amplificação, pode-se constatar que o gene LIC11469 foi detectado em todas as espécies e sorovares testados, incluindo na espécie saprofítica *L. biflexa*. Este dado está em concordância com análise *in silico* feita através do programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), que mostra a presença de um gene em *L. biflexa* com 70% de similaridade com o gene LIC11469 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

O gene LIC10827 não foi detectado em todos os sorovares de *L. interrogans*, estando ausente no sorovar Canicola, porém foi detectado nas espécies *L. borgpetersenii* sorovares Whitcombi, Cynoptery e Castelonis, bem como na espécie *L. santarosai* sorovar Shermani. O diferente perfil eletroforético observado sugere que o gene seja diferente em outras espécies em relação ao número de pares de bases.



**Figura 5 - Análise da conservação genômica dos genes LIC10411, LIC12891, LIC13305, LIC11030, LIC11469 e LIC10827 em cepas de *Leptospira*.** DNA genômico das espécies patogênicas *L. interrogans* sorovares: Copenhageni, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo, *L. borgpetersenii* sorovares: Castellonis, Whitcombi, Cynoptery e Grippotyphosa, *L. santarosai* sorovar Shermani, *L. noguchii* sorovar Panama, e da espécie saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc, foram submetidas à reação de PCR com oligonucleotídeos específicos desenhados de acordo com o genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. A integridade das amostras foi verificada por amplificação do fragmento de DNA 16S ribossomal. Não foi adicionado DNA nas reações de controle negativo (-).

O gene LIC11030 foi detectado em todos os sorovares de *L. interrogans*, estando em acordo com análise *in silico* feita através do programa BLAST, que mostrou que a sequência está ausente em *L. biflexa* e *L. borgpetersenii*.

Para os genes LIC13305 e LIC12891, houve amplificação apenas nos sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae de *L. interrogans*.

Finalmente, o gene LIC10411 foi detectado em quase todos os sorovares de *L. interrogans* testados, estando ausente apenas no sorovar Pomona. Além disso, o gene foi detectado também em *L. borgpetersenii* sorovares Castellonis, Cynoptery e Grippotyphosa, e também nas espécies *L. santarosai* sorovar Shermani, *L. noguchii* sorovar Panama, e na espécie saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc. Este dado, porém, está em desacordo com análise *in silico* feita, utilizando o programa BLAST uma vez que através dela não é detectada a presença deste gene na espécie *L.*

*biflexa*. Este dado, porém, está em desacordo com análise *in silico* feita, uma vez que através dela não é detectada a presença deste gene na espécie *L. biflexa*. Esta amplificação pode ser devido a um anelamento do oligonucleotídeo em região do genoma que possua alguma similaridade com essa sequência.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que entre os genes testados, LIC11469 e LIC10411 parecem ser os mais conservados entre as diferentes espécies e sorovares de *Leptospira*.

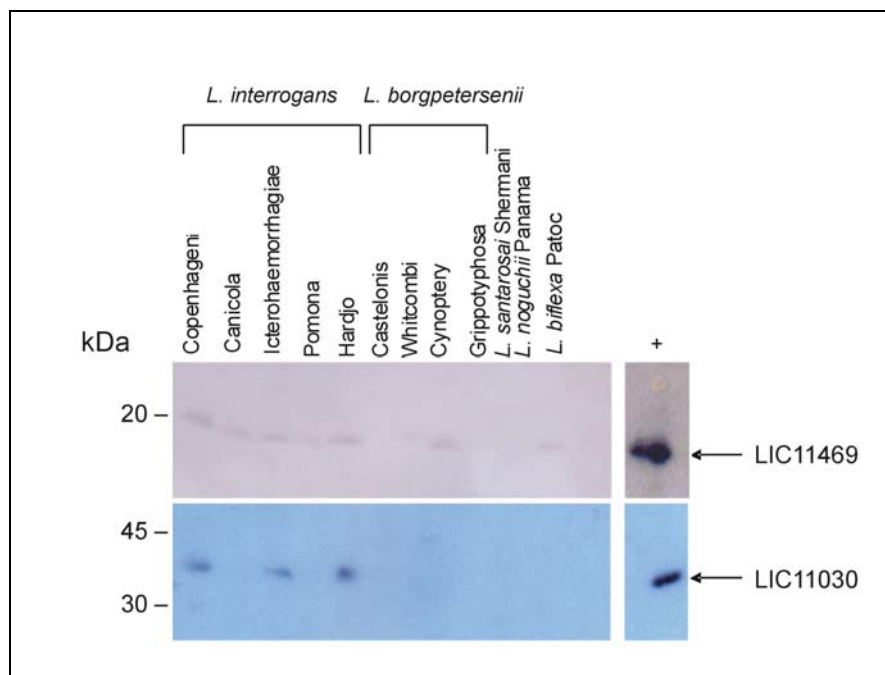
#### **4.3 Análise da expressão dos genes entre os diversos sorovares de *Leptospira***

Para complementar o estudo da conservação investigamos a expressão desses genes através de *Immunoblotting* e RT-PCR. Avaliamos a expressão (tanto por RT-PCR quanto por *Immunoblotting*) apenas dos genes LIC11030 e LIC11469 devido a resultados obtidos em ensaios que serão descritos mais adiante, onde verificamos que apenas as proteínas codificadas por estes genes foram expressas, e definimos esses dois genes como os objetos de estudo deste trabalho.

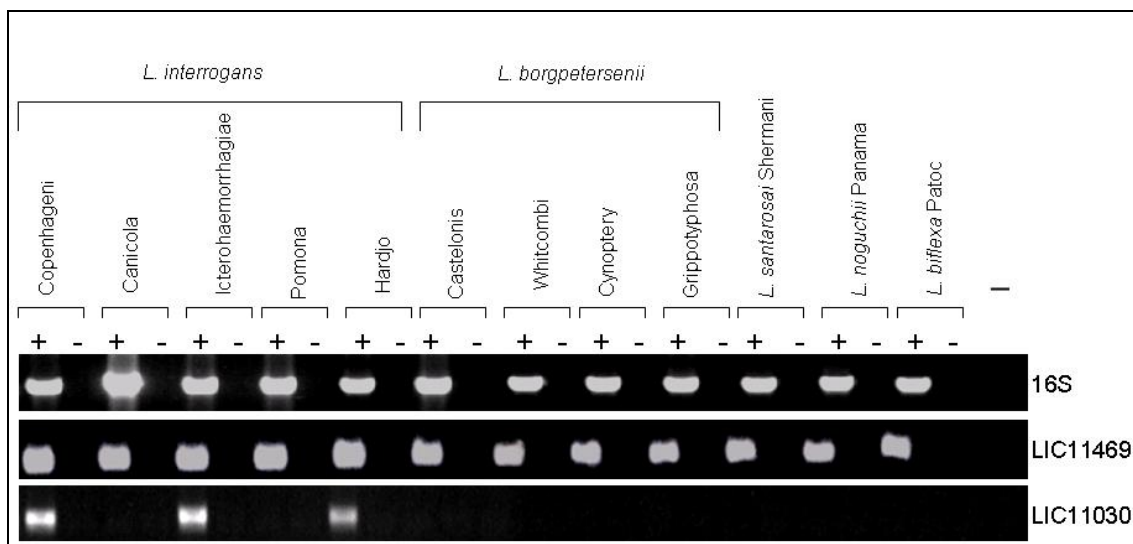
Para o ensaio de *Immunoblotting*, os extratos obtidos da cultura de *Leptospira* foram aplicados em PAGE/SDS e transferidos para membrana de nitrocelulose. A diluição dos anticorpos anti-rLIC11469 e anti-rLIC11030 utilizada foi 1:100, sendo que o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) foi utilizado na diluição 1:1.000. O resultado está apresentado na Figura 6.

Os RNAs extraídos foram submetidos a RT-PCR, empregando os mesmos oligonucleotídeos do estudo de conservação mais um par para o RNAr 16S, que serve como controle da qualidade e quantidade de transcritos. O perfil eletroforético dos produtos obtidos está apresentado na Figura 7, e está em acordo com os dados obtidos no *Immunoblotting*.

Entre os genes avaliados, LIC11469 se destacou por apresentar amplificação em todas as cepas de *Leptospira* testadas, resultado este que está em concordância com o estudo de conservação do DNA genômico. O gene LIC11030, por sua vez, embora conservado no DNA genômico de todas as cepas de *L. interrogans* testadas, no estudo de expressão mostrou-se presente apenas nos sorovares Copenhageni, Icterohaemorrhagiae e Hardjo de *L. interrogans*.



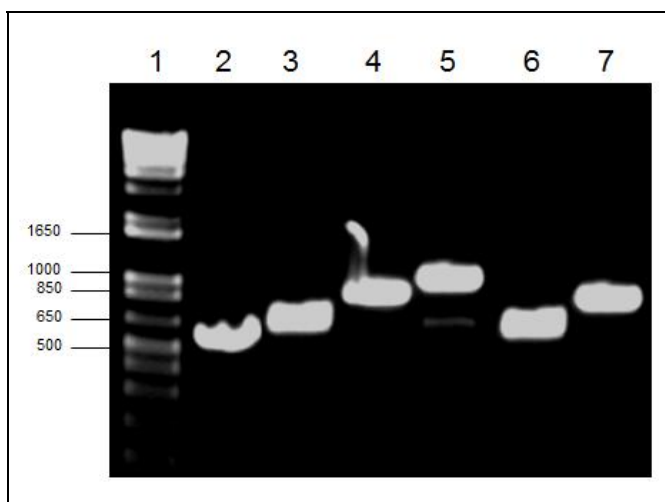
**Figura 6 - Análise da expressão dos genes LIC11469 e LIC11030 em cepas de *Leptospira* através de *Immunoblotting*.** O extrato proteico total obtido dos diversos sorovares de *Leptospira*, foi aplicado em PAGE/SDS e transferido pra membrana de nitrocelulose, sendo as proteínas nativas correspondentes aos genes detectadas por anticorpos policlonais específicos.



**Figura 7 - Análise da expressão dos genes LIC11469 e LIC11030 em cepas de *Leptospira* através de eletroforese em gel de agarose 1%.** O cDNA obtido através do RNAm das espécies patogênicas *L. interrogans* sorovares: Copenhageni, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo, *L. borgpetersenii* sorovares: Castellonis, Whitcombi, Cynoptery e Grippotyphosa, *L. santarosai* sorovar Shermani, *L. noguchii* sorovar Panama, e da espécie saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc, foi submetido à reação de PCR com oligonucleotídeos específicos desenhados de acordo com o genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. A integridade das amostras foi verificada por amplificação do fragmento de DNA 16S ribossomal. Em RT+, a transcriptase reversa estava presente, e em RT -, a transcriptase reversa foi omitida. Não foi adicionado DNA nas reações de controle negativo (-).

#### 4.4 Clonagem

As sequências de DNA correspondentes aos genes LIC12891, LIC10411, LIC13305, LIC11030, LIC11469 e LIC10827, foram amplificadas a partir do DNA genômico extraído da cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 pela técnica de PCR. Os produtos de PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e apresentaram o tamanho esperado (Figura 8).



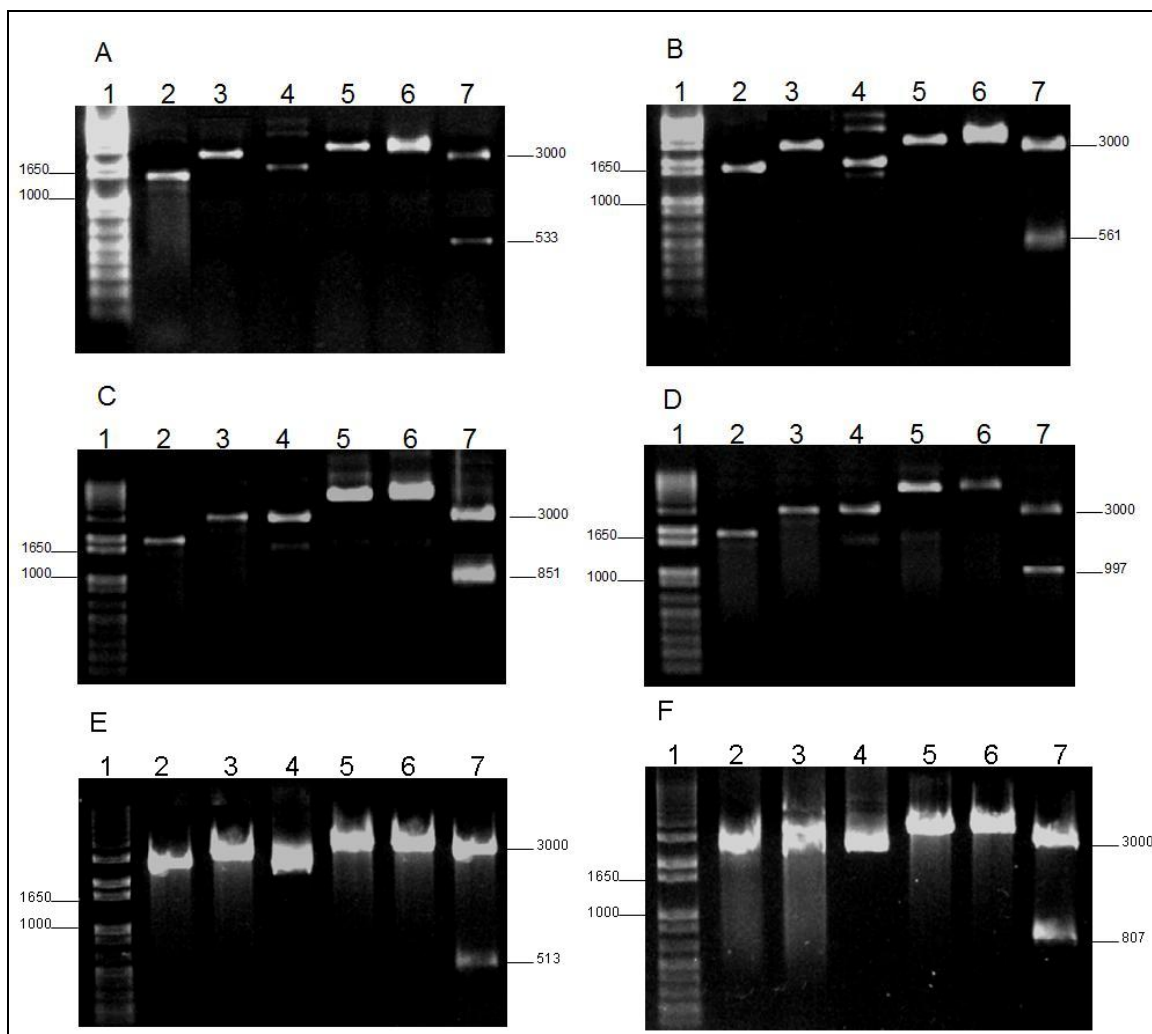
**Figura 8 - DNA de interesse amplificado através de reação de PCR.** Os insertos obtidos apresentaram o número de pares de bases esperado. **1-** 1 Kb Plus DNA Ladder (marcador molecular). **2-** LIC12891, de 533 pb. **3-** LIC10411, de 561 pb. **4-** LIC13305, de 851 pb. **5-** LIC11030, de 997 pb. **6-** LIC10827, de 807 pb..

O inserto de DNA obtido através da reação de PCR foi utilizado para clonagem em vetor pGEM-T Easy (Promega). Esse é um vetor linearizado, com uma timidina 3'-terminal em ambas as extremidades, o que permite a ligação dos produtos de PCR e evita recircularização do vetor. Esse vetor contém ainda o sítio de múltipla clonagem interrompendo a região codificadora da enzima  $\beta$ -galactosidase. Essa inativação permite a identificação dos clones recombinantes por seleção azul/branco em placas contendo LB/Amp, IPTG e X-Gal. Quando não há introdução do inserto de DNA, a *E. coli* expressa a  $\beta$ -galactosidase que degrada X-Gal e a colônia torna-se azul.

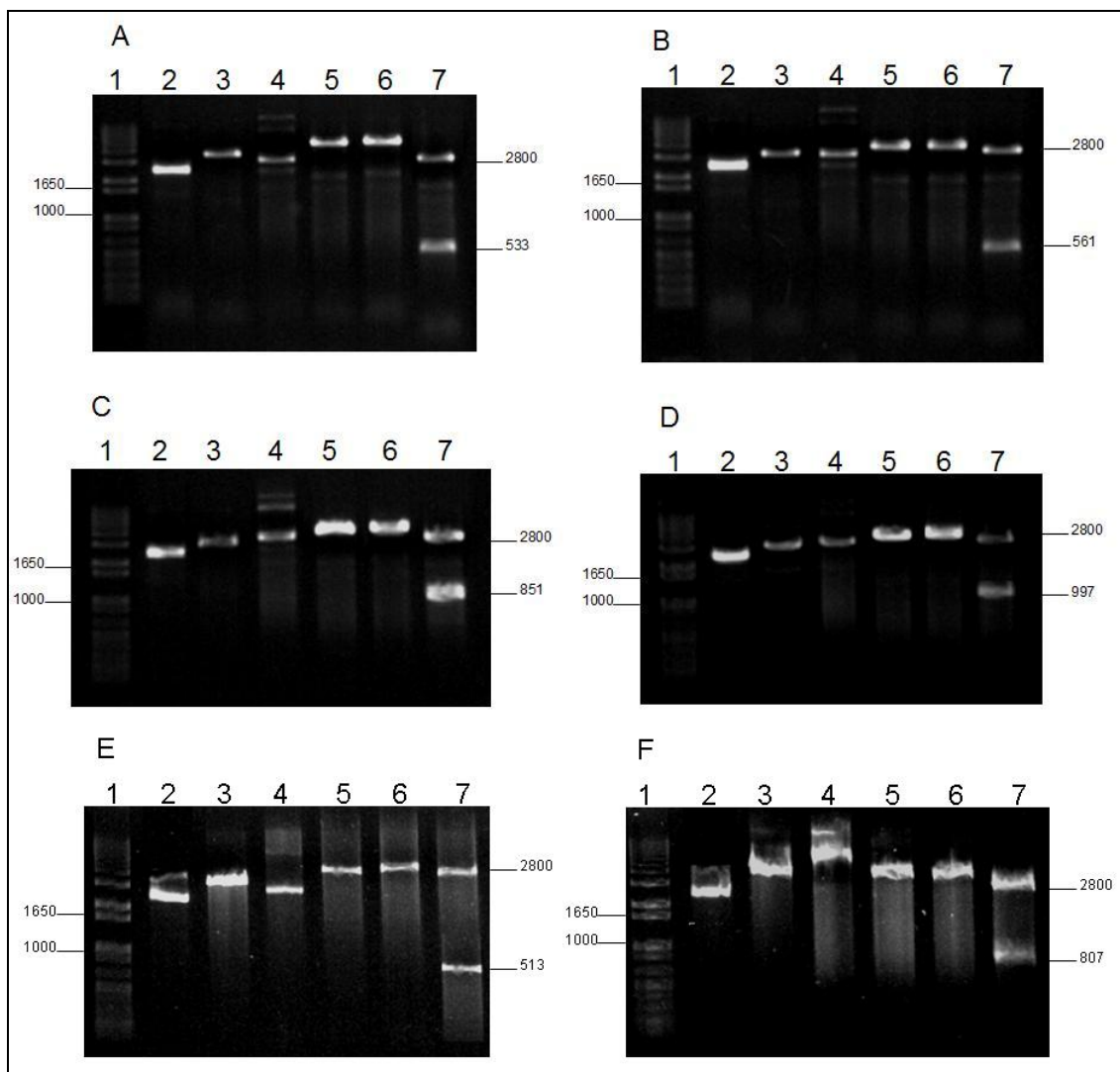
Após transformação em bactérias competentes e extração de DNA, os plasmídeos referentes aos clones foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI/HindIII* para certificação da presença de insertos (Figura 9).



Os insertos foram removidos dos plasmídios recombinantes (pGEM-T Easy/inserto) através de ensaio de restrição utilizando as enzimas *XhoI*/*HindIII* e subclonados no vetor de expressão pAE. Através extração rápida por fenol-clorofórmio, foram selecionados dois clones positivos. Após a obtenção do DNA plasmidial (pAE/inserto), os clones foram digeridos com as enzimas de restrição correspondentes para certificação da presença de inserto (Figura 10).



**Figura 9 - Insetos de DNA obtidos por digestão do DNA plasmidial (pGEM/inserto).** A) LIC12891. B) LIC10411. C) LIC13305. D) LIC11030. E) LIC11469. F) LIC10827. Sendo que 2: pGEM selvagem. 3: pGEM selvagem digerido com *XhoI*. 4: pGEM/inserto circular. 5: pGEM/inserto digerido com *XhoI*. 6: pGEM/inserto digerido com *HindIII*. 7: pGEM/inserto digerido com *XhoI*/*HindIII*. 1. marcador molecular (Kb Plus DNA Ladder).



**Figura 10 – Insertos de DNA obtidos por digestão do DNA plasmidial (pAE/inserto). A)** LIC12891. **B)** LIC10411. **C)** LIC13305. **D)** LIC11030. **E)** LIC11469. **F)** LIC10827. Sendo que **2:** pAE selvagem. **3:** pAE selvagem digerido com *XhoI*. **4:** pAE/inserto circular. **5:** pAE/inserto digerido com *XhoI*. **6:** pAE/inserto digerido com *HindIII*. **7:** pAE/inserto digerido com *XhoI/HindIII*. **1.** marcador molecular (Kb Plus DNA Ladder).

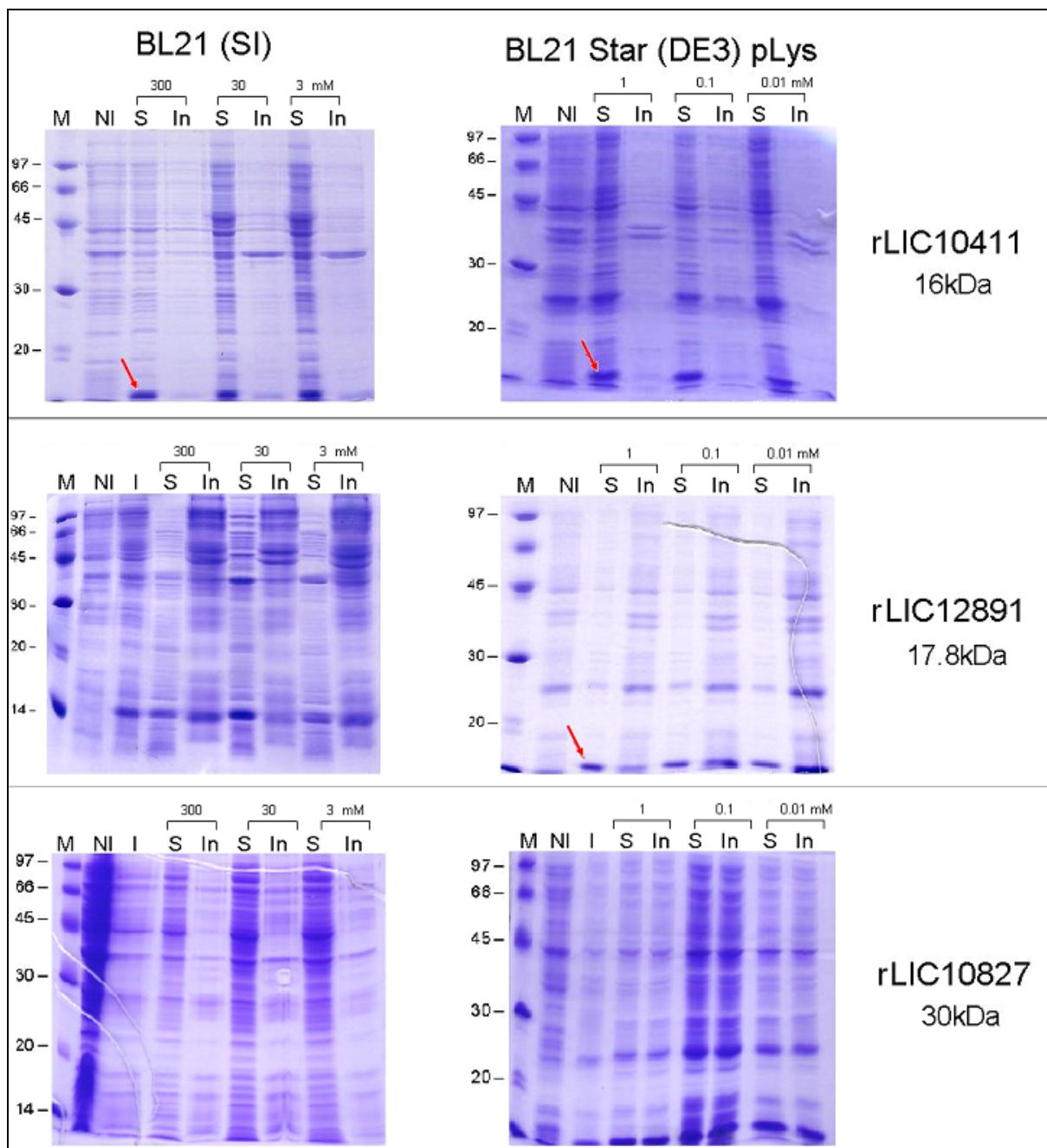
As construções foram sequenciadas e confirmou-se a integridade das seqüências de nucleotídeos dos clones obtidos, bem como a introdução destes na fase correta de leitura, conforme demonstrado no ANEXO B.

#### 4.5 Expressão das proteínas recombinantes

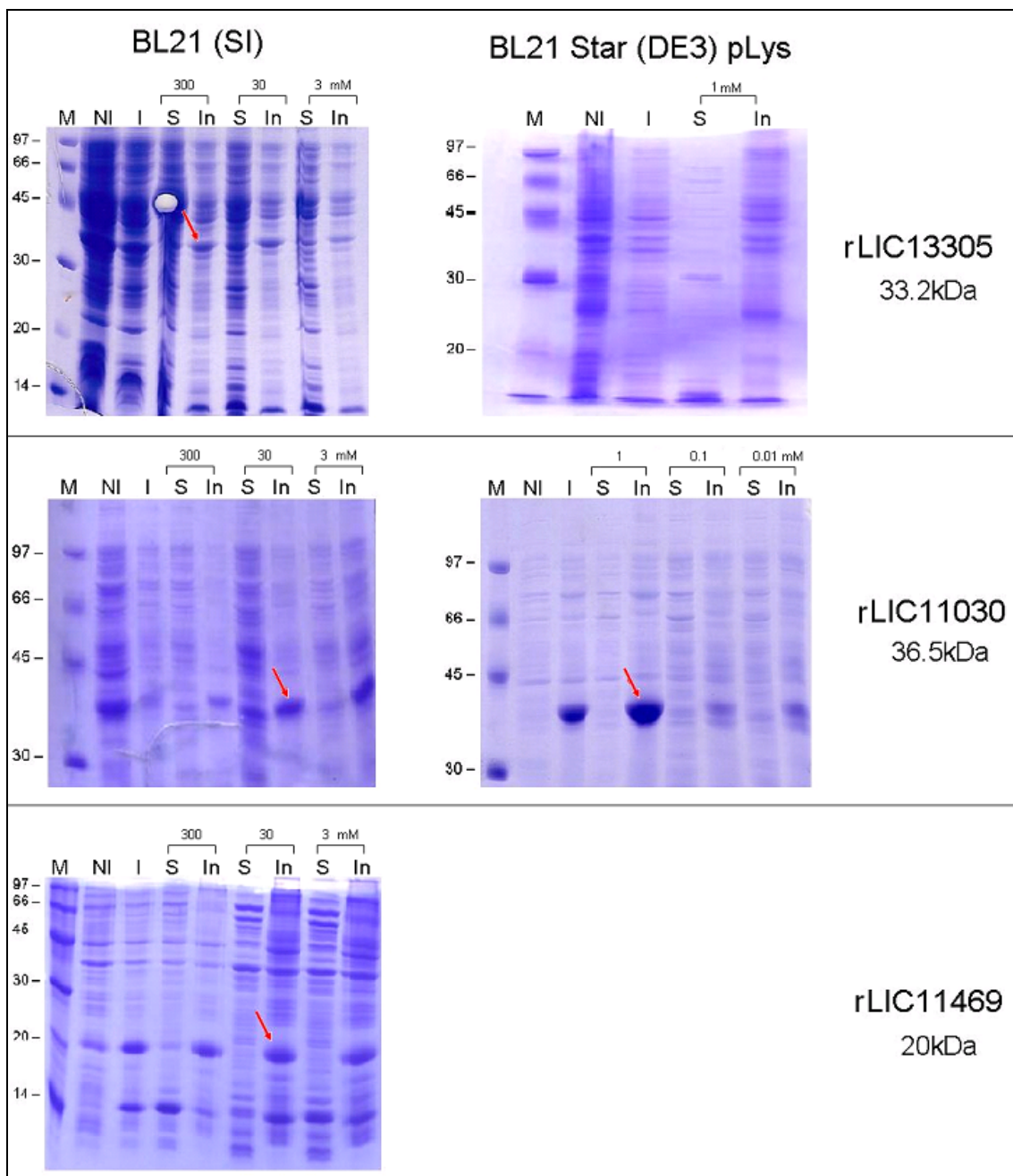
Para obtenção das proteínas recombinantes envolvidas neste projeto foi realizado um estudo de indução com as cepas de *E. coli* BL21 SI e BL21 Star (DE3) pLys, com os indutores NaCl ou IPTG, respectivamente, em diferentes concentrações.

A cepa de *E. coli* BL21 (SI) possui o gene T7 RNA polimerase integrado ao genoma sob o controle do promotor *proU* indutível por NaCl (BHANDARI e GOWRISHANKAR, 1997). As diferentes cepas de *E. coli* DE3 possuem o gene da T7 RNA polimerase, porém, sob controle do promotor *lac UV5*, o qual é induzido por IPTG. A cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) pLys carrega também o plasmídeo pLys que produz pequenas quantidades de T7 lisozima, um inibidor natural da T7 RNA polimerase. A redução da expressão basal da T7 RNA polimerase permite a expressão de proteínas recombinantes mais estáveis, particularmente para proteínas tóxicas (STUDIER et al., 1991).

Bactérias *E. coli* foram transformadas e induzidas em diferentes concentrações de indutor: 3, 30 e 300 mM de NaCl para *E. coli* BL21 SI, e 0,01; 0,1 e 1 mM de IPTG para a cepa BL21 Star (DE3) pLys. Após indução, as bactérias foram lisadas e as frações protéicas obtidas (sobrenadante e sedimento) analisadas em PAGE/SDS (Figuras 11 e 12).



**Figura 11 - Análise da expressão das proteínas recombinantes através de PAGE/SDS.** **M:** padrão de massa molecular. **NI:** extrato não induzido. **I:** extrato induzido total. **S:** fração solúvel. **In:** fração insolúvel. A massa molecular de cada proteína recombinante está indicada na figura. Indução com diferentes concentrações de NaCl (BL21 SI) ou IPTG (BL21 Star DE3 pLys). As setas vermelhas indicam a possível expressão das proteínas recombinantes.



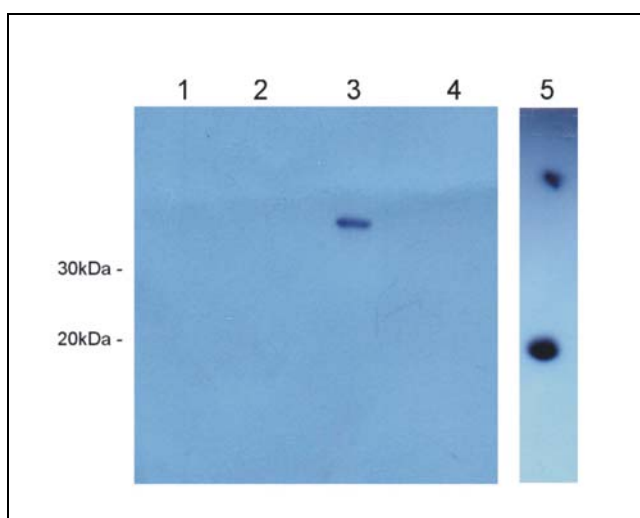
**Figura 12 - Análise da expressão das proteínas recombinantes através de PAGE/SDS.** **M:** padrão de massa molecular. **NI:** extrato não induzido. **I:** extrato induzido total. **S:** fração solúvel. **In:** fração insolúvel. A massa molecular de cada proteína recombinante está indicada na figura. Indução com diferentes concentrações de NaCl (BL21 SI) ou IPTG (BL21 Star DE3 pLys). As setas vermelhas indicam a possível expressão das proteínas recombinantes.

A proteína recombinante rLIC11030 foi expressa na forma insolúvel em ambas as cepas testadas. Porém, a cepa escolhida para expressão dessa proteína foi a BL21 Star (DE3) pLys, onde a expressão foi aparentemente melhor e sem escape na fração não induzida, pela adição de 1 mM de IPTG, à temperatura de 30 °C. A expressão da proteína recombinante rLIC11469 foi avaliada apenas na cepa de *E. coli* BL21 SI, onde houve forte expressão pela adição de 30 mM de NaCl, sendo por esse motivo não avaliada em outras cepas.

Não houve expressão da LIC10827 em nenhuma das cepas testadas, uma vez que nenhuma banda foi observada com massa molecular esperada (30 kDa).

Foi feito um ensaio de *Immunoblotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-polihistidina para confirmar a expressão das proteínas recombinantes rLIC10411, rLIC12891 e rLIC13305 (Figura 13). Foram aplicados em PAGE/SDS 20 µL das frações onde aparentemente houve expressão: *E. coli* BL21 SI (indução com 300 mM de NaCl – fração solúvel) para rLIC10411, *E. coli* BL21 Star (DE3) pLys para rLIC12891 (indução com 1 mM de IPTG - fração solúvel) e *E. coli* BL21 SI (indução com 300 mM de NaCl - fração insolúvel) para rLIC13305. Como controle positivo utilizou-se a proteína rLIC11030 purificada, na concentração de 2 µg.

Esse ensaio permitiu constatar que as proteínas rLIC10411, rLIC12891 e rLIC13305 não foram expressas, sendo por esse motivo excluídas do projeto. Os estudos prosseguiram com os genes LIC11030 e LIC11469.



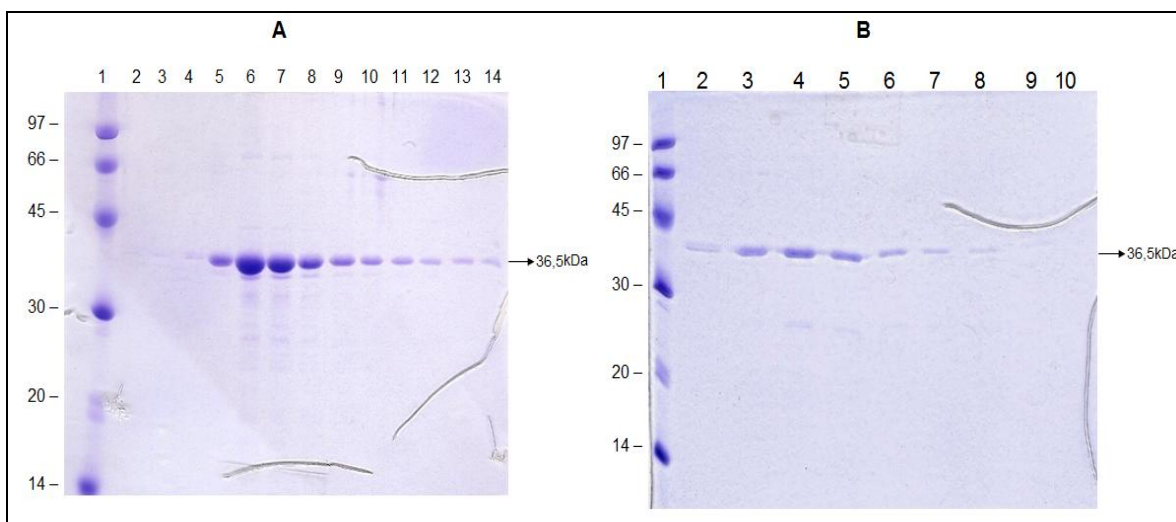
**Figura 13 - Ensaio de *Immunoblotting* utilizando anticorpo anti-polihistidina.** Revelação com kit ECL. 1: proteína rLIC10411 de ~16 kDa. 2: proteína rLIC12891 de ~17,8 kDa. 3: proteína rLIC11030 de ~36,5 kDa (controle positivo). 4: proteína rLIC13305 de ~33 kDa. 5: proteína rLIC11469 de ~20 kDa.



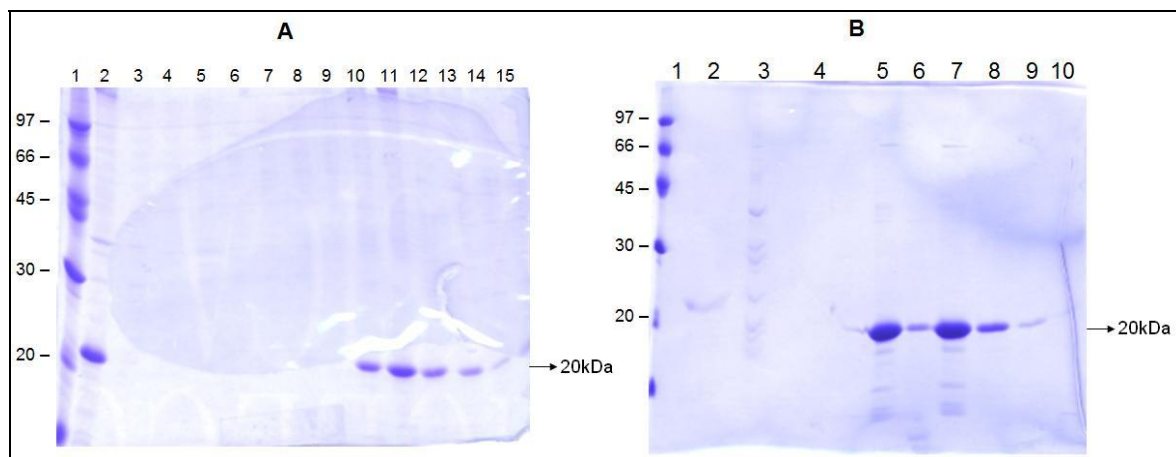
#### 4.6 Purificação e diálise das proteínas recombinantes

Como o sistema de expressão de proteínas utilizado neste projeto adiciona uma sequência de 6 resíduos de histidina na extremidade N-terminal da proteína, a purificação das proteínas recombinantes obtidas foi feita através de resina de afinidade a metal. A proteína recombinante se liga ao  $\text{Ni}^{2+}$  via resíduos de histidinas, os contaminantes são lavados com tampão contendo baixa concentração de imidazol e a proteína de interesse é eluída com alta concentração de imidazol.

As proteínas recombinantes rLIC11030 e rLIC11469 foram expressas sob a forma insolúvel, sendo solubilizadas com tampão contendo 8M ureia ou 6 M guanidina e posteriormente submetidas a purificação por cromatografia de afinidade a metal, utilizando dois métodos para remoção do agente denaturante: através de gradiente de remoção de ureia, com auxílio do sistema de purificação ÄKTAPrime plus (GE Healthcare), ou diluição por gotejamento em tampão de renaturação seguida de purificação utilizando a resina “Chelating Sepharose” (GE Healthcare) previamente carregada com  $\text{Ni}^{2+}$ . As frações eluídas foram analisadas por PAGE/SDS, como demonstram as figuras 14 e 15.



**Figura 14 - Análise da purificação da proteína recombinante rLIC11030, de ~36.5 kDa.**  
**A)** diluição por gotejamento, seguida de purificação com Chelating Sepharose: **5-14** – frações eluídas **B)** utilizando sistema de purificação ÄKTAPrime plus: **2-8** – frações eluídas. **1:** padrão de massa molecular.

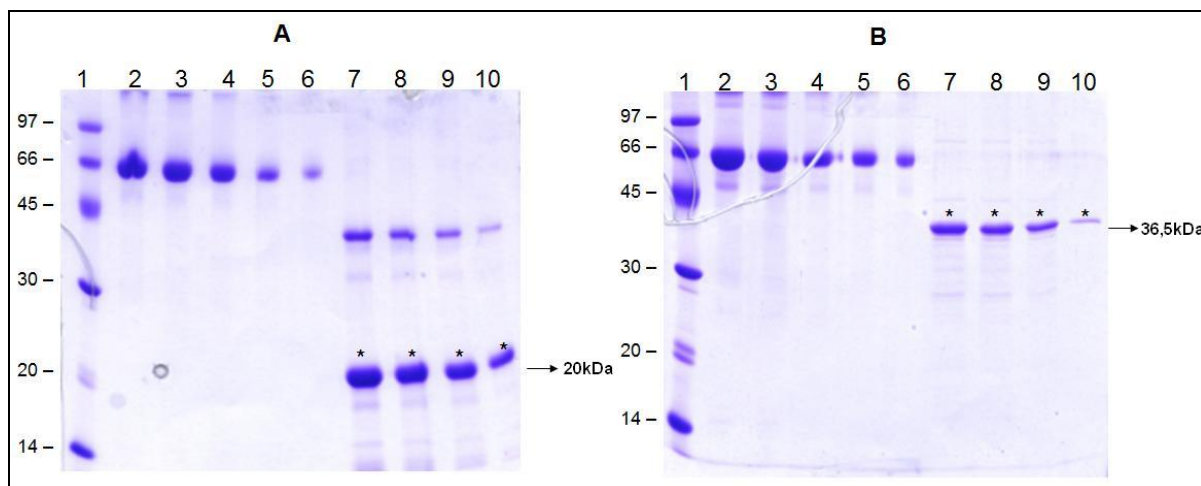


**Figura 15 - Análise da purificação da proteína recombinante rLIC11469, de ~20 kDa. A)** diluição por gotejamento, seguida de purificação com Chelating Sepharose: **10-15** – frações eluídas **B)** utilizando sistema de purificação ÄKTAPrime plus: **5-8** – frações eluídas. **1:** padrão de massa molecular.

Escolhemos o sistema de diluição por gotejamento em tampão de renaturação para a rLIC11030, seguida de purificação com Chelating Sepharose, no qual obtivemos maior rendimento (0,2 mg/L de cultura de *E. coli*). Por outro lado, no caso da rLIC11469, houve maior rendimento na purificação (0,8 mg/L de cultura de *E. coli*) quando foi feita a renaturação no sistema ÄKTAPrime plus (GE Healthcare).

Após diálise, a concentração das proteínas recombinantes foi estimada através da comparação destas com concentrações pré-estabelecidas de BSA, sendo de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para rLIC11030 e 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para rLIC11469. Como esperado, bandas majoritárias de 20 e 36,5 kDa correspondentes as proteínas rLIC11469 e rLIC11030, respectivamente, foram observadas em PAGE/SDS (Figura 16). As bandas secundárias de ~40 kDa observadas nas amostras correspondentes à rLIC11469 (Figura 16A) tratam-se possivelmente da formação de dímeros durante ou após a diálise, já que as bandas apresentam o dobro do tamanho esperado da proteína, de ~20 kDa.

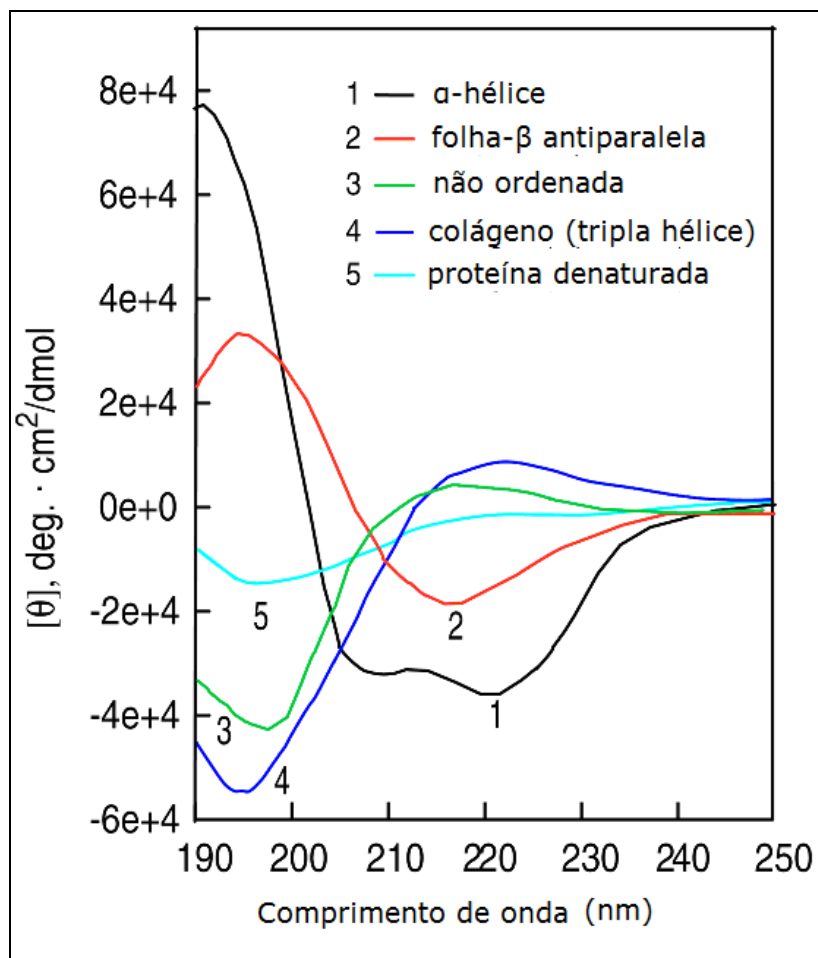




**Figura 16 - Quantificação das proteínas recombinantes através de curva de BSA. A)** rLIC11469. **B)** rLIC11030. **1:** massa molecular. **2-5:** BSA nas concentrações 4, 3, 2, 1 e 0,5 µg, respectivamente. **7-10:** proteína aplicada no gel PAGE/SDS nos volumes de 20, 15, 10 e 5 µL, respectivamente.

#### 4.7 Espectroscopia circular

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica para o estudo dos elementos de estrutura secundária das proteínas ( $\alpha$ -hélices, estruturas  $\beta$  e estrutura randômica) os quais contribuem na formação da sua estrutura terciária (JOHNSON JR., 1990). Esta técnica está baseada no fato de que moléculas com centros assimétricos (quirais) absorvem a luz circularmente polarizada para a direita diferentemente da luz circularmente polarizada para a esquerda provocando um desvio no ângulo da polarização da luz incidente para a direita ou esquerda (elipticidade), que é medido pelo polarímetro. Os cromóforos que originam os espectros de CD em peptídeos e proteínas são as ligações amida, os resíduos aromáticos e as pontes dissulfeto (GREENFIELD, 2006). Diferentes elementos estruturais possuem espectros característicos (Figura 17) (GREENFIELD, 2006). Por exemplo, proteínas  $\alpha$ -hélice possuem faixas negativas a 208 e 222 nm e uma faixa positiva a 193 nm. Proteínas com estruturas folhas- $\beta$  antiparalelas bem definidas apresentam faixas negativas a 218 nm e faixas positivas a 195 nm, ao passo que proteínas não ordenadas apresentam elipticidade muito baixa ao redor dos 210 nm e faixas negativas próximas de 195 nm (HOLZWARTH e DOTY, 1965).



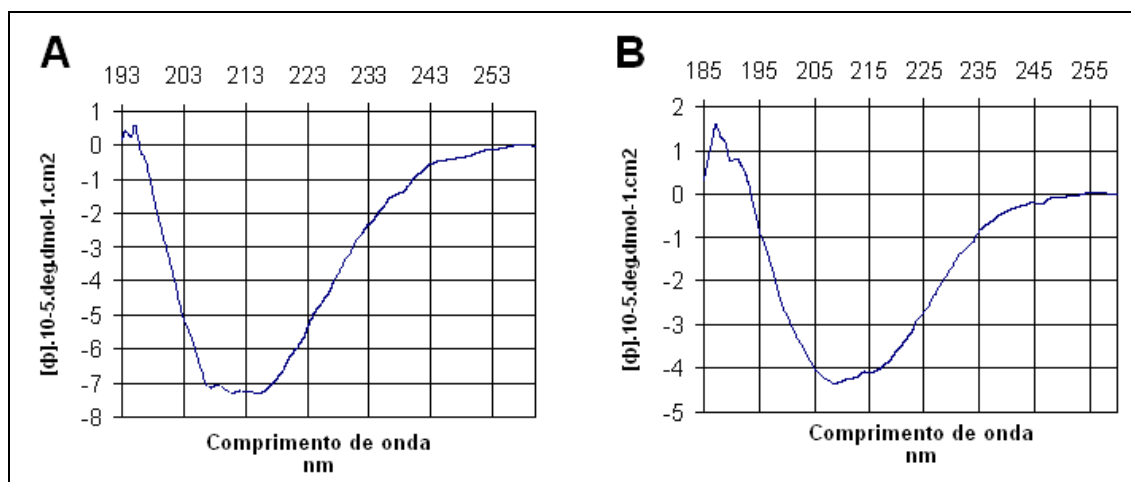
**Figura 17 - Espectroscopia circular (CD) de polipeptídeos e proteínas com estruturas secundárias representativas.** 1: proteína com estrutura α-hélice. 2: proteína com estrutura de folhas-β antiparalelas. 3: estrutura não ordenada. 4: estrutura de tripla hélice do colágeno. 5: proteína desnaturada – colágeno.

Fonte: Modificado de Greenfield, 2006.

O ensaio de dicroísmo foi feito utilizando as proteínas no mesmo tampão no qual foram dialisadas após a purificação, que mantém as proteínas estáveis – PBS para rLIC11030 (Figura 18A) e 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 50 mM NaCl para rLIC11469 (Figura 18B). Ambos os tampões contém o íon  $\text{Cl}^-$ , que interfere no ensaio (JOHNSON JR., 1990), motivo pelo qual o espectro de ambas as proteínas apresentou muita interferência.

O ensaio mostrou que ambas as proteínas recombinantes possuem estrutura secundária mesmo após a purificação e diálise, o que nos dá segurança para prosseguir com experimentos de caracterização de função e imunogenicidade das proteínas em estudo. Os espectros obtidos para rLIC11469 mostram comprimentos de onda na faixa negativa com dois picos de 208 e 215 nm aproximadamente,

sugerindo a presença de estruturas  $\alpha$ -hélice. Por outro lado, espectros obtidos para rLIC11030 apresentam comprimento de onda de cerca de 210 nm, com um único pico na faixa negativa, assemelhando-se a estrutura de folhas- $\beta$ .

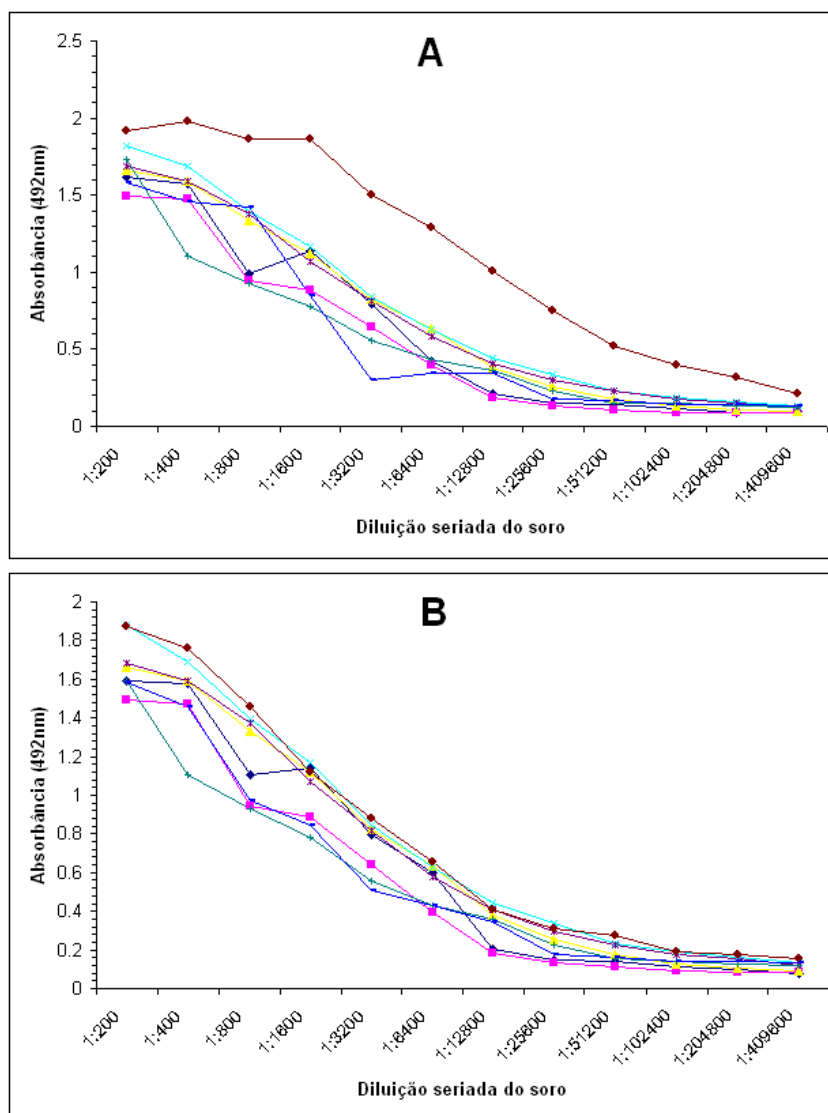


**Figura 18 - Espectros de Dicroísmo Circular. A)** Proteína rLIC11469. **B)** Proteína rLIC11030. Os espectros apresentados representam uma média de 5 escaneamentos, de 185 a 260 nm.

#### 4.8 Avaliação da atividade imunogênica das proteínas recombinantes em camundongos

Os animais foram imunizados com 3 doses de 10  $\mu$ g de proteína recombinante em suspensão contendo *Alhydrogel* (2% Al(OH)<sub>3</sub>, Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca) como adjuvante na concentração final de 12%, por via subcutânea e sangrados via plexo retro-orbital após a terceira dose. Os soros obtidos foram avaliados quanto a presença de anticorpos anti-rLIC11030, e anti-rLIC11469 por ELISA.

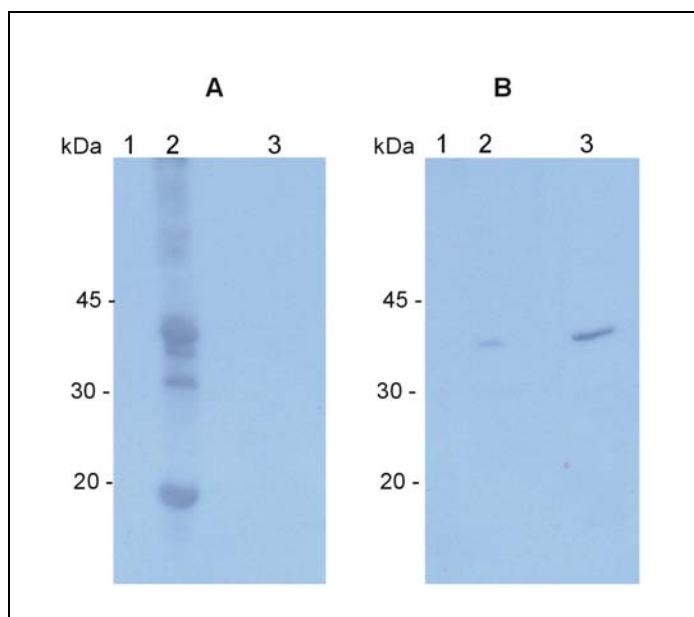
Ambos os grupos imunizados (proteína rLIC11030 e rLIC11469) apresentaram altos títulos de anticorpos após a terceira dose. Os títulos aumentaram após cada dose de imunização, mostrando que o reforço na imunização foi importante para obtenção de bons títulos. O grupo controle, por sua vez, não apresentou quaisquer títulos. A média dos títulos de anticorpos obtidos por cada grupo após cada imunização foi de 1:276.490 para rLIC11030 e de 1:204.800 para rLIC11469 (Figura 19).



**Figura 19 - Presença de anticorpos nos soros dos camundongos imunizados. A) rLIC11030. B) rLIC11469.** Os animais foram imunizados subcutaneamente com três doses contendo 10 µg de proteína recombinante em hidróxido de alumínio *Alhydrogel* (Brenntag) na concentração final de 12%. O título dos soros obtidos foi determinado por ELISA contra a proteína homóloga (250 ng). A figura apresenta os títulos obtidos após a terceira imunização, e cada linha representa um animal.

Adicionalmente, foi realizado um ensaio de *Immunoblotting* para verificar a especificidade dos anticorpos policlonais produzidos em camundongos contra as proteínas recombinantes rLIC11469 e rLIC11030. Para isso, 2 µg de cada proteína recombinante foram aplicados em PAGE/SDS 15% e transferidos para membrana de nitrocelulose. Foram utilizados os soros policlonais anti-rLIC11469 ou anti-rLIC11030 na diluição 1:1.000. Cada soro apresentou reatividade com a proteína de forma específica, na massa molecular esperada (Figura 20), confirmando a especificidade dos anticorpos policlonais contra as proteínas recombinantes.

Pode ser observada uma fraca banda inespecífica de aproximadamente 37 kDa (Figura 20B, linha 2) quando foi utilizado soro anti-rLIC11030, devido provavelmente a anticorpos produzidos contra a cauda de polihistidina, presente também na rLIC11469, já que a massa molecular coincide com a forma dimérica observada (Figura 20A, linha 2) dessa proteína.



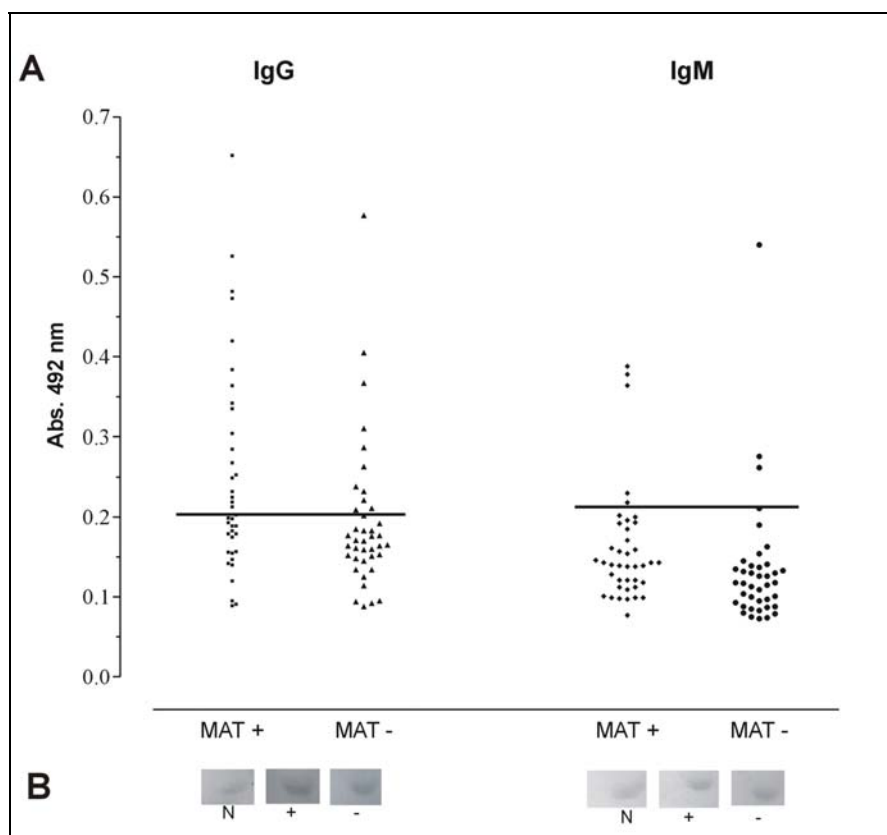
**Figura 20 - Ensaio de *Immunoblotting* com anticorpos policlonais produzidos em camundongos. A) anticorpo anti-rLIC11469 na diluição 1:1.000. B) anticorpo anti-rLIC11030 na diluição 1:1.000. 1: marcador de peso molecular. 2: rLIC11469 (~20 kDa). 3: rLIC11030 (~36,5 kDa).**

#### **4.9 Detecção de anticorpos IgG e IgM contra proteínas recombinantes em soros de pacientes diagnosticados com leptospirose**

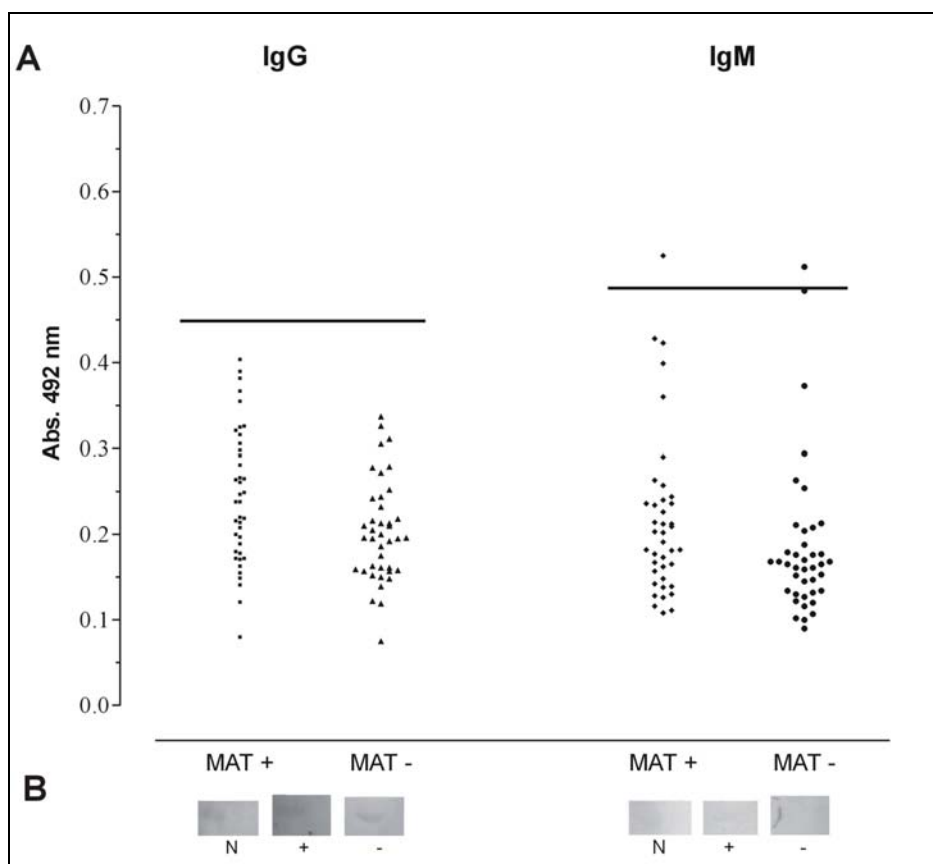
No intuito de identificar se alguma das proteínas em estudo é expressa durante o processo de infecção e pode ser aplicada como antígeno num kit diagnóstico, investigamos a reatividade com soros de 40 pacientes através de ELISA. Das 80 amostras testadas, 40 amostras eram referentes a fase convalescente da doença, com resultado MAT positivo, e as outras 40 amostras, correspondiam a fase inicial da doença, com resultado MAT negativo (ANEXO A). O MAT é o método referência para diagnóstico da leptospirose, recomendado pela Organização Mundial de Saúde. Nesse teste, o soro de pacientes é submetido a uma reação com suspensões de antígenos de diferentes sorovares de leptospiras vivas (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2003). Porém o MAT 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 (CUMBERLAND; EVERARD; LEVETT, 1999). 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 (ATZINGEN, 2009).

Os soros tiveram sua reatividade avaliada quanto ao tipo de anticorpo produzido, IgG e IgM (os resultados estão ilustrados nas figuras 21 e 22). Inicialmente estabeleceu-se o valor de *cutoff* a partir de 10 amostras de soros de indivíduos normais que relataram não ter entrado em contato com a doença e que foram diagnosticados com resultado MAT negativo. Para este ensaio foram feitas incubações prévias dos soros com extrato de *E. coli* na concentração de 25%, evitando com isso a interferência de proteínas contaminantes de *E. coli* presentes na amostra dos recombinantes.



**Figura 21 - Análise da reatividade contra rLIC11469 de soros de indivíduos diagnosticados para leptospirose.** 80 amostras de soros de indivíduos foram analisados quanto à presença de anticorpos IgG ou IgM específicos por ELISA (A) ou *Immunoblotting* (B) onde, **N**: soros normais; **+**: pool de soros MAT positivo; **-**: pool de soros MAT negativo.



**Figura 22 - Análise da reatividade contra rLIC11030 de soros de indivíduos diagnosticados para leptospirose.** 80 amostras de soros de indivíduos foram analisados quanto à presença de anticorpos IgM específicos por ELISA **(A)** ou *Immunoblotting* **(B)** onde, **N**: soros normais; **+**: pool de soros MAT positivo; **-**: pool de soros MAT negativo.

A identificação de antígenos de leptospira que possam ser reconhecidos ainda na fase inicial da leptospirose, como a proteína Lp29 (NEVES et al., 2007) e as proteínas MPL17 e MPL21 (OLIVEIRA et al., 2008), poderão facilitar o diagnóstico e tratamento precoce da doença. Além do mais, testes sorológicos baseados em proteínas recombinantes oferecem algumas vantagens como maior sensibilidade e especificidade, já que maiores concentrações de antígenos podem ser usadas (NEVES et al., 2007).

Para a proteína rLIC11469 o percentual de respondedores da fase convalescente, tanto para IgG quanto para IgM, foi significativamente maior que na fase inicial da doença, enquanto que para rLIC11030 não houve respondedores para as fases inicial e convalescente para IgG. A proteína rLIC11469 foi também a que apresentou maior frequência de respondedores, para anticorpos IgG (25%) e IgM

(7,5%) na fase inicial da doença, sugerindo que essa proteína é expressa durante a leptospirose.

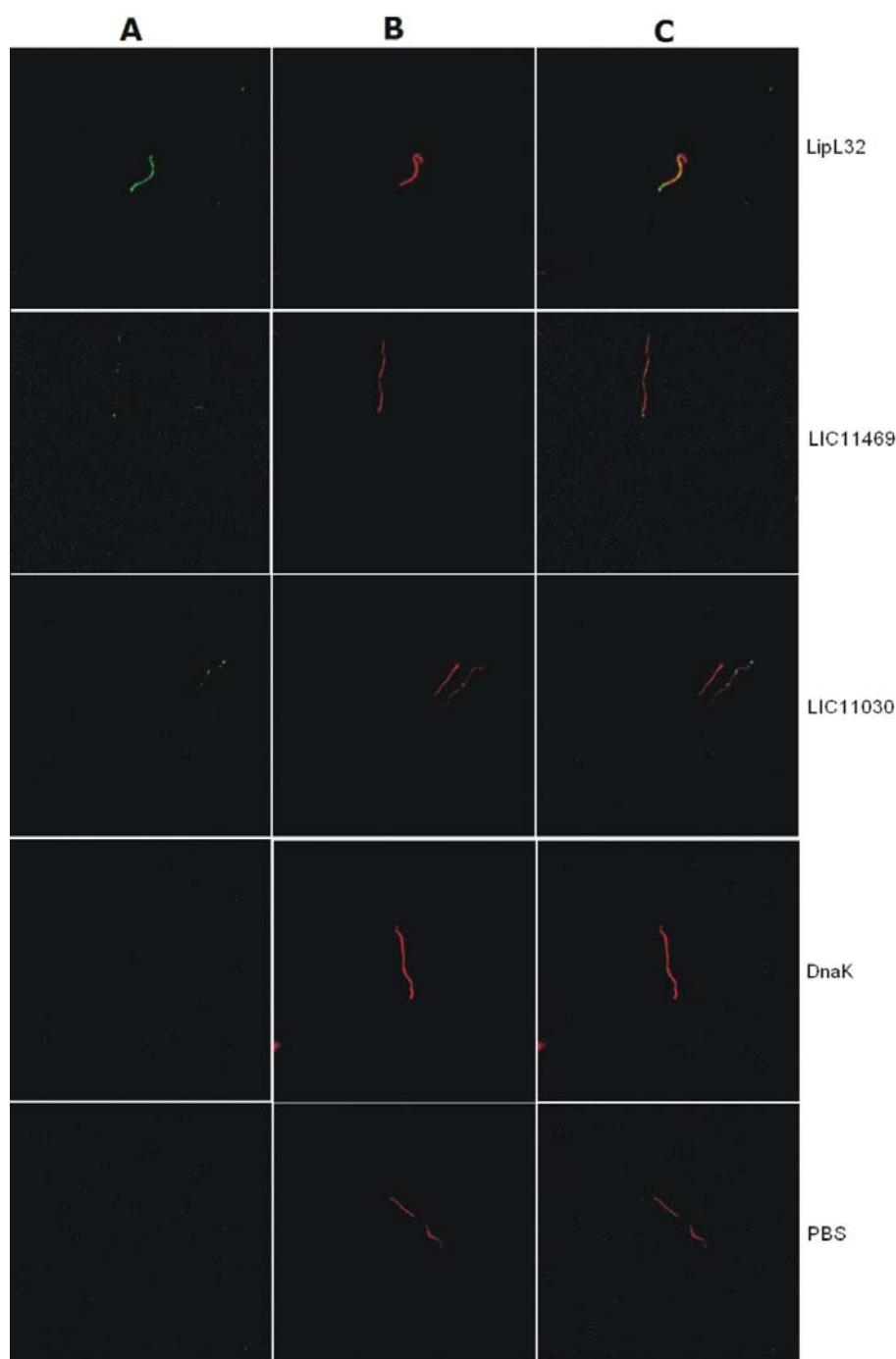
O ensaio de ELISA permite a manutenção da estrutura conformacional das proteínas, e assim, a reatividade observada deve-se a anticorpos presentes no soro que reconhecem epítomos estruturados, como os que podem ser encontrados na superfície da bactéria. No entanto, o indivíduo infectado também produz anticorpos contra epítomos lineares ou intracelulares que podem ser apresentados após a fagocitose das leptospiras (ATZINGEN, 2009). Estes anticorpos foram então avaliados através de *Immunoblotting* empregando um *pool* com soros de pacientes de cada fase (diluição 1:100), bem como soros de indivíduos normais e foram avaliados quanto a presença de anticorpos IgG e IgM. As proteínas rLIC11469 e rLIC11030 demonstraram ser imunorreativas tanto a soros da fase clínica como da fase subclínica (Figuras 21 e 22).

#### **4.10 Estudos de localização celular**

##### **4.10.1 Ensaio de imunofluorescência de fase líquida**

Foi empregada a técnica de imunofluorescência de fase líquida que permite detectar na superfície da bactéria viva as proteínas nativas correspondentes. Inicialmente, as leptospiras vivas são marcadas com iodeto de propídeo (marcação em vermelho), e após adição do anticorpo policlonal específico para cada proteína, são marcadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), que confere a marcação em verde na superfície da bactéria, se a proteína nativa correspondente se encontra na superfície. Como controle, foi empregado soro contra duas proteínas abundantes em leptospira e bem caracterizadas: DnaK, uma proteína citoplasmática, e LipL32, uma proteína de superfície bem caracterizada, com grande número de cópias (CULLEN et al., 2005; HAAKE et al., 2000; MALMSTROM et al., 2009). Embora presente em grande número de cópias (MALMSTROM et al., 2009), não foi detectada nenhuma fluorescência verde referente a fluoresceína quando anti-DnaK foi adicionado, atestando a integridade da bactéria. Por meio desse experimento, pode-se verificar que as proteínas em estudo são expressas na superfície de leptospiras (Figura 23), como observado pela marcação em verde.



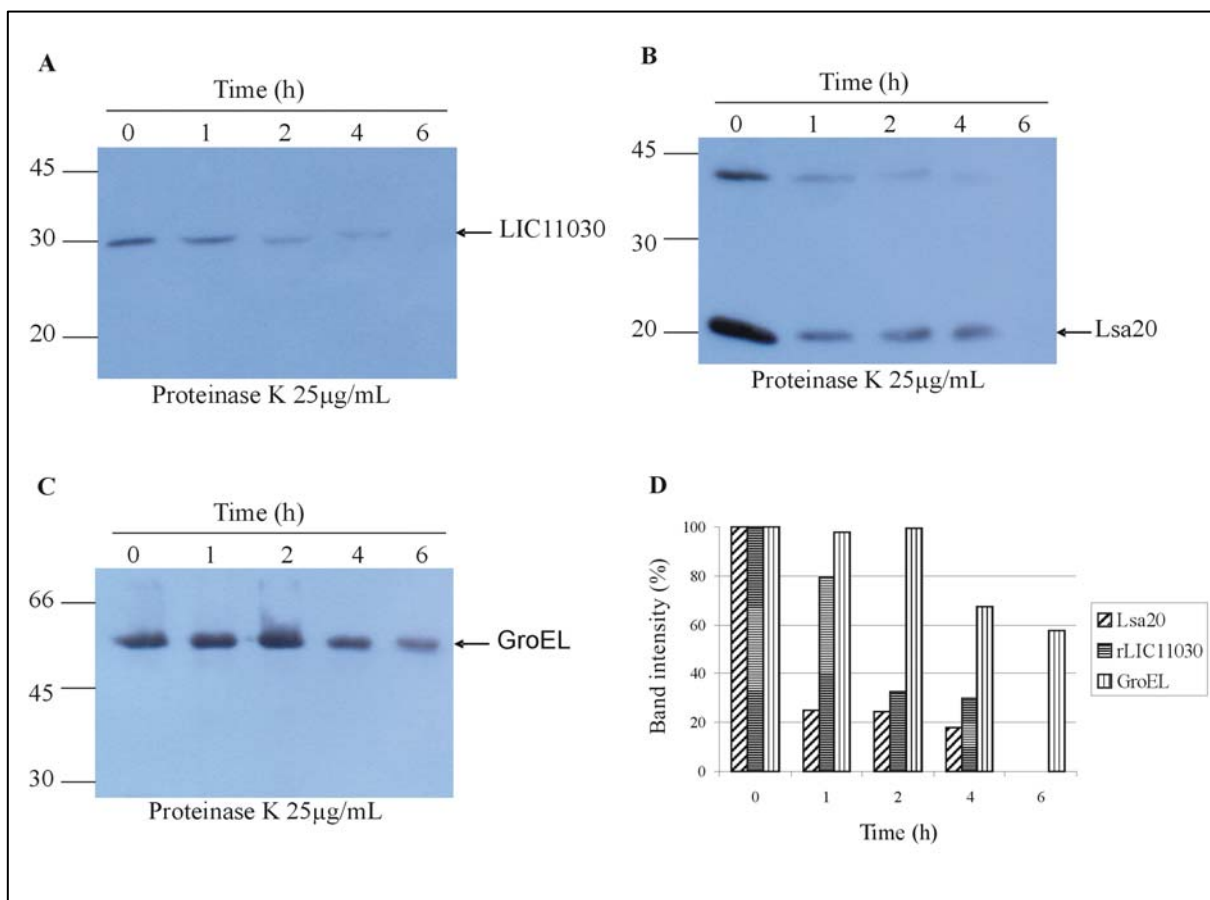


**Figura 23 - Localização das proteínas codificadas pelos genes LIC11469 e LIC11030 em *L. interrogans* por imunofluorescência de fase líquida.** Microscopia confocal foi realizada com *L. interrogans* sorovar Copenhageni vivas, utilizando antisoro policlonal anti-rLIC11469, anti-rLIC11030, anti-LipL32 (lipoproteína de membrana externa) ou anti-DnaK (proteína citoplasmática). Anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi utilizado para detectar anticorpos ligados à superfície de leptospiros. As leptospiros foram identificadas utilizando o marcador de DNA iodeto de propídeo (coluna **A**); coluna **B** se refere à marcação com FITC enquanto **C** representa as imagens compostas. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Aumento de 600X.

#### 4.10.2 Ensaio de acessibilidade com Proteinase K

Foram realizados experimentos de localização celular com tratamento de leptospiros intactas para determinar se as proteínas em estudo, preditas de membrana externa, são de fato localizadas na superfície da bactéria. A proteinase já havia sido anteriormente empregada para outras espiroquetas (BRYKSIN et al., 2010 ; COX et al., 2010 ; PROBERT; ALLSUP; LEFEBVRE, 1995) e bactérias (MORRISSEY et al., 2002) para avaliar a exposição das proteínas na superfície. Pinne e Haake (PINNE e HAAKE, 2009) e Oliveira et al. (OLIVEIRA et al., 2010) usaram proteinase K para acessar proteínas de membrana externa em *Leptospira*.

No presente estudo, pudemos observar que as proteínas codificadas pelos genes LIC11469 e LIC11030 foram suscetíveis à clivagem com proteinase K, como foi demonstrado pela redução progressiva do sinal no *Immunoblotting* em função do tempo de exposição das leptospiros vivas à PK, sendo que após 6 horas de incubação não havia mais sinal correspondente às proteínas (Figura 24). A proteína citoplasmática GroEL (HAAKE e MATSUNAGA, 2002), usada como controle negativo para a proteólise da superfície, não foi, ou foi apenas levemente clivada sob as mesmas condições testadas. Esse dado, juntamente com a imunofluorescência de fase líquida, sugere que LIC11469 e LIC11030 são proteínas de membrana externa de *Leptospira*.



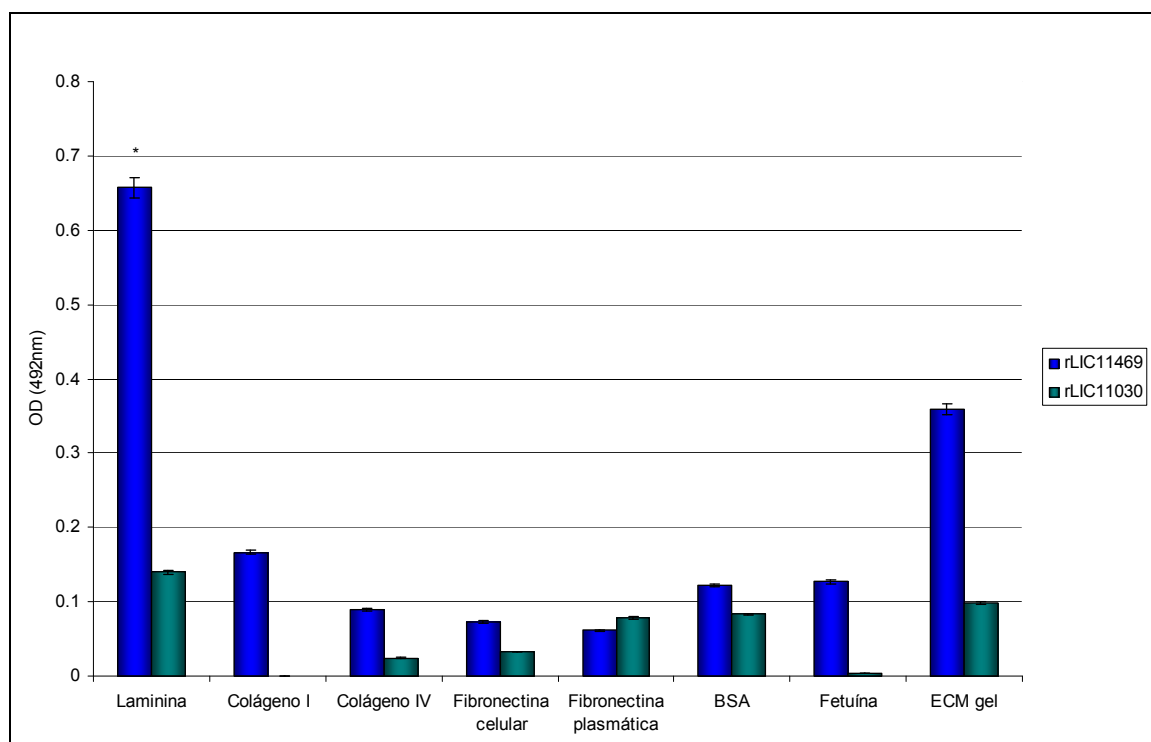
**Figura 24 - Ensaio de acessibilidade as proteínas com Proteínase K. A) LIC11030. B) LIC11469. C) GroEL (proteína citoplasmática).** *Leptospiras* viáveis foram incubadas com 25 µg/mL de proteínase K por 0, 1, 2, 4 e 6 h. Aproximadamente 30 mg do extrato total foi aplicado em PAGE/SDS. Após a transferência, os extratos imobilizados foram submetidos à análise de *imunoblotting* utilizando anticorpos específicos, na diluição 1:100 (LIC11469 e LIC11030) ou 1:1.000 (GroEL). A posição das proteínas está indicada pelas setas à direita. **D)** As densidades óticas das bandas foram medidas e sua porcentagem relativa foi baseada na medição no tempo zero (sem adição de proteínase K).

#### 4.12 Ensaio de adesão a componentes da matriz extracelular

A interação de patógenos a componentes de matriz extracelular contribui com a colonização primária dos tecidos do hospedeiro. Sob condições normais, os componentes de matriz extracelular não estão expostos a bactérias, sendo acessados após trauma do tecido seguido de injúria mecânica ou química ou consequência de uma infecção bacteriana através da ação de toxinas e enzimas líticas (LJUNGH et al., 1996). No entanto, os mecanismos pelos quais a *Leptospira* spp. invade e coloniza os tecidos hospedeiros são pouco conhecidos (ATZINGEN, 2009).

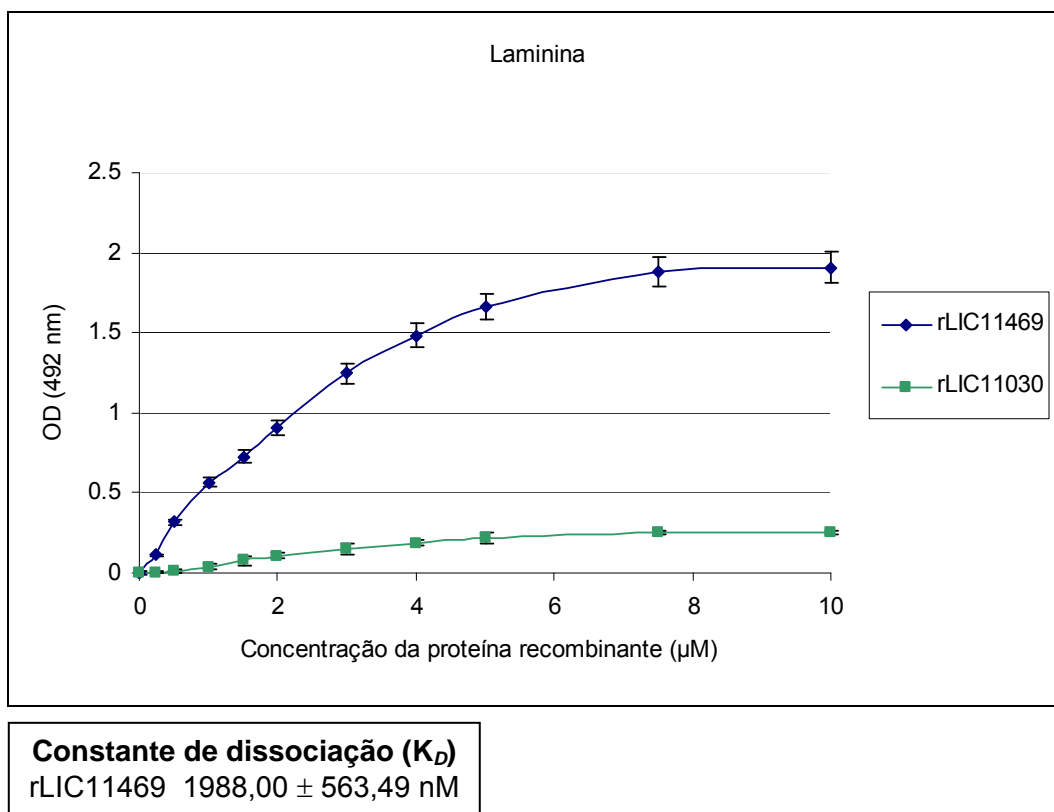
A aderência aos tecidos do hospedeiro é mediada por proteínas expostas a superfície, expressas pelos microorganismos durante a infecção. Nosso grupo descreveu a primeira proteína de leptospira ligante a laminina, Lsa24 (BARBOSA et al., 2006), e outras adesinas posteriormente relatadas foram LigA e LigB (CHOY et al., 2007); proteínas da família Len (STEVENSON et al., 2007) (ATZINGEN, 2009); Lsa21 (ATZINGEN et al., 2008); LipL32 (HAUK et al., 2008; HOKE et al., 2008); Lsa27 (LONGHI et al., 2009); Lp95 (ATZINGEN et al., 2009); TlyC (CARVALHO et al., 2009); LipL53 (Oliveira et al., 2010); Lsa63 (VIEIRA et al., 2010) e OmpL37 (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010).

Laminina é uma importante componente da membrana basal e fibronectina é um dos principais componentes da matriz extracelular e do soro, ambas são glicoproteínas e cujos sítios de interação com célula ou bactéria caracterizados. O colágeno possui múltiplos sítios de interação ao longo de sua estrutura (ATZINGEN, 2009). Utilizamos BSA e fetuína como controles (CAMERON, 2003), além de uma mistura de componentes da ECM, e os resultados estão apresentados na figura 25.



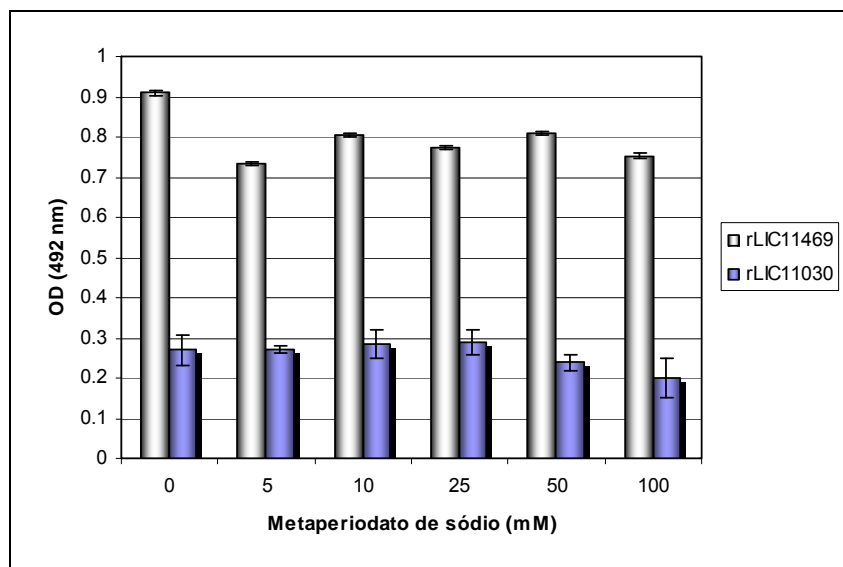
**Figura 25 - Adesão das proteínas recombinantes a componentes de matriz extracelular imobilizados.** Os poços foram revestidos com laminina, colágeno I e IV, fibronectina celular e plasmática, ECM gel e as proteínas controle, BSA e fetuína. A adesão das proteínas recombinantes aos componentes foi avaliada por um ensaio baseado na técnica de ELISA. Os resultados estão apresentados como magnitude de adesão em relação ao controle negativo (BSA), arbitrariamente ajustado para 1. Os dados representam uma média e o desvio padrão de um ensaio em triplicata (\* $P,0.01$ ).

A proteína codificada pelo gene LIC11469 se destacou pela aderência a laminina. A especificidade dessa interação foi avaliada de forma quantitativa e uma adesão dose-dependente foi observada em razão da concentração da proteína recombinante (Figura 26). A constante de dissociação da rLIC11469 com laminina foi de  $1988,00 \pm 563,49$  nM.



**Figura 26 - Experimentos de dose-dependência da ligação da proteína rLIC11469 à laminina.** Cada ponto foi realizado em triplicata e expresso como a média dos valores de absorvância a 492 nm  $\pm$  o desvio padrão de cada ponto. A proteína rLIC11030 foi incluída como controle negativo. A constante de dissociação ( $K_D$ ) é mostrada no quadro abaixo e foi calculada baseada nos dados de ELISA da proteína rLIC11469, que alcançou o equilíbrio na concentração de  $\sim 8 \mu\text{M}$ .

O papel dos carboidratos da laminina na interação com a proteína recombinante rLIC11469 foi investigado através do tratamento da laminina com metaperiodato. Esse reagente oxida os grupamentos hidroxil dos carboidratos sem prejudicar a estrutura da cadeia polipeptídica (WOODWARD; YOUNG JR.; BLOODGOOD, 1985). Não houve uma redução significativa da adesão da rLIC11469 à laminina (Figura 27), sugerindo a não participação dos resíduos de açúcar da laminina na ligação da rLIC11469 a esse componente.



**Figura 27 - Contribuição dos resíduos de açúcar para a interação da rLIC11469 com a laminina.** A proteína rLIC11030 foi incluída como controle negativo. Laminina imobilizada foi tratada com metaperiodato de sódio (0 a 100 mM) por 1 hora a temperatura ambiente no escuro. Cada ponto representa a média dos valores de absorvância a 492 nm  $\pm$  o desvio padrão de três experimentos independentes. Não houve redução significativa na ligação, se comparada à laminina não tratada (0 mM).

#### 4.13 Ensaio de adesão a componentes do soro humano

O dano às células do hospedeiro pela ativação do sistema complemento pode ser prevenido por um número de proteínas regulatórias do complemento, incluindo fator H. Fator H é uma proteína plasmática de 150 kDa que está presente no soro na concentração aproximada de 500  $\mu$ g/mL. Vários patógenos de importância médica e veterinária produzem uma ou mais proteínas de membrana externa que ligam especificamente ao fator H (VERMA et al., 2006).

A atividade proteolítica adquirida pela subversão de proteases por patógenos, como plasmina, demonstrou ser importante em várias infecções bacterianas. Plasmina é uma protease serina componente do sistema fibrinolítico, que tem o zimógeno plasminogênio (PLG) como seu principal componente (COLEMAN; ROEMER; BENACH, 1999).

A interação do PLG humano tem sido sugerida como uma característica que contribui significativamente para a virulência de muitos patógenos por facilitar a ancoragem inicial ao endotélio. Através da captura do PLG do hospedeiro em sua superfície, seguida pela ativação em plasmina, a bactéria se torna um organismo proteolítico, uma característica que contribui para a degradação de componentes da

ECM, penetração tecidual e invasão (LAHTEENMAK; KUUSELA; KORHONEN, 2001).

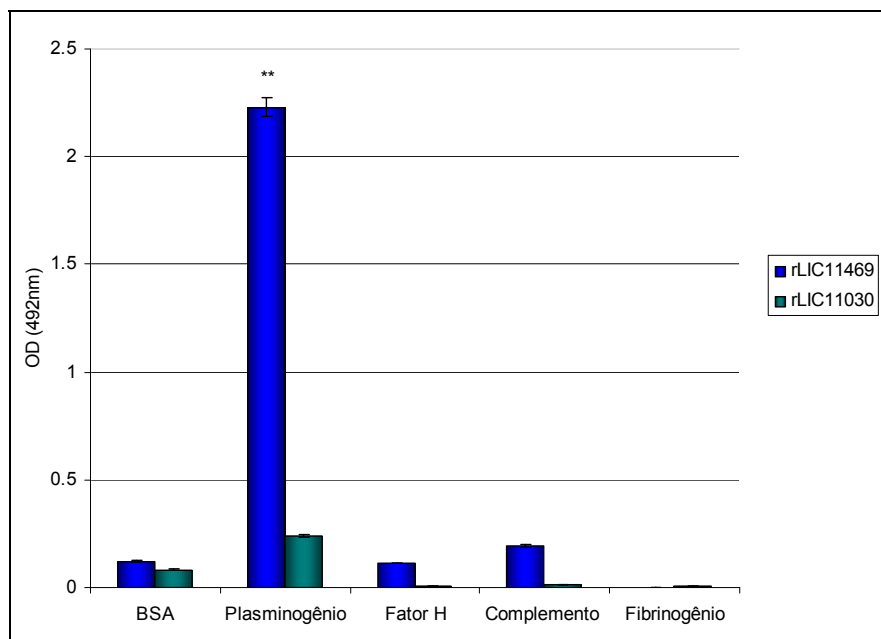
Nosso grupo foi o primeiro a mostrar a ligação de várias proteínas de superfície de *L. interrogans* ao PLG (VIEIRA et al., 2010). Dessa forma, utilizamos a técnica de ELISA para avaliar se as proteínas rLIC11469 e rLIC11030 também apresentavam ligação ao PLG e/ou outros componentes do soro humano.

Já foi demonstrado anteriormente que *L. interrogans* liga-se ao plasminogênio e ao fator H e possivelmente várias proteínas poderiam atuar como receptores (MERI et al., 2005; VIEIRA et al., 2009). Esse dado nos levou a investigar se as proteínas de superfície selecionadas são capazes de se ligar ao plasminogênio e/ou ao fator H *in vitro*.

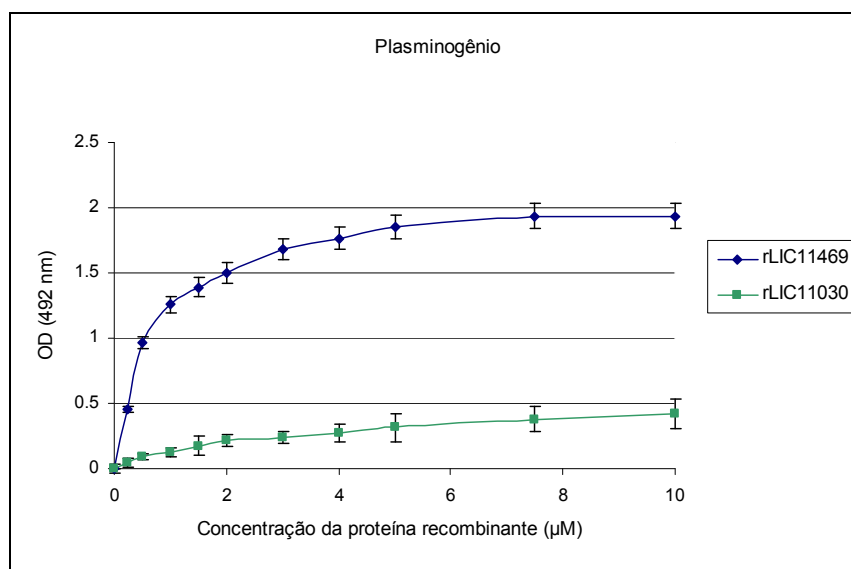
Plasminogênio, fator H, uma mistura de componentes do complemento ou fibrinogênio foram imobilizados nas placas, incubados com as proteínas recombinantes individualmente e os resultados obtidos de três experimentos independentes são mostrados na Figura 28.

Somente a proteína rLIC11469 apresentou forte ligação ao plasminogênio, já que a ligação da rLIC11030 não foi estatisticamente significativa. Nenhuma das proteínas recombinantes apresentou ligação aos outros componentes testados.

As interações entre as proteínas recombinantes e o plasminogênio foram avaliadas por uma curva de dose-resposta, como mostra a Figura 29. A ligação dose-dependente e saturável foi observada quando foram empregadas concentrações crescentes (0 a 10  $\mu$ M) de proteína recombinante rLIC11469, incubadas com uma concentração fixa de plasminogênio (1  $\mu$ g). Baseado nos dados do ELISA, a constante de dissociação da rLIC11469 com plasminogênio foi de  $509,13 \pm 77,47$  nM.



**Figura 28 - Ligação das proteínas recombinantes a componentes do soro humano.** Plasminogênio, fator H, *mix* de componentes do complemento ou fibrinogênio foram imobilizados em placas de ELISA e incubados com as proteínas recombinantes rLIC11469 ou rLIC11030. BSA foi usado como controle negativo para ligação não específica (\*\* $P,0.0004$ ).



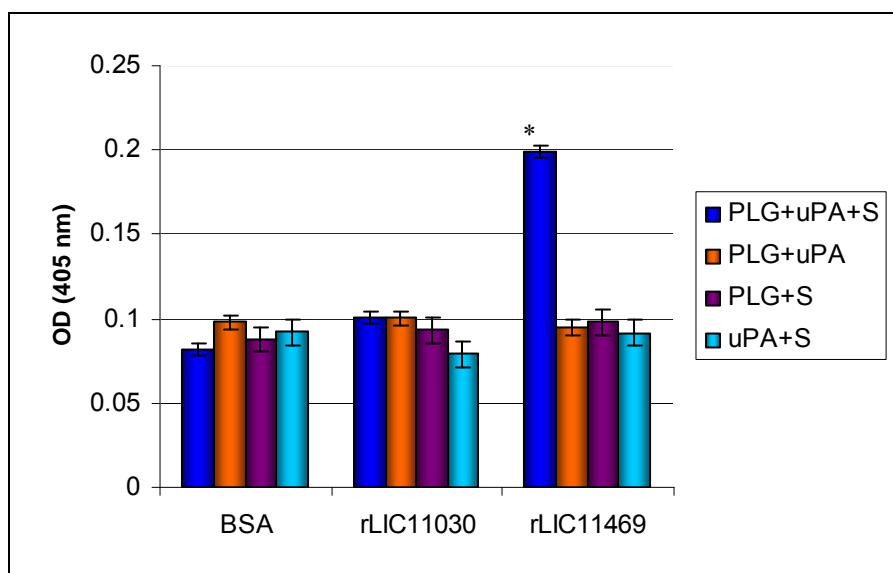
**Constante de dissociação ( $K_D$ )**  
 rLIC11469  $509,13 \pm 77,47$  nM

**Figura 29 - Experimentos de dose-dependência da ligação da proteína rLIC11469 ao plasminogênio.** Cada ponto foi realizado em triplicata e expresso como a média dos valores de absorvância a 492 nm  $\pm$  o desvio padrão de cada ponto. A proteína rLIC11030 foi incluída como controle negativo. A constante de dissociação ( $K_D$ ) é mostrada no quadro abaixo e foi calculada baseada nos dados de ELISA da proteína rLIC11469, que alcançou o equilíbrio na concentração de  $\sim 9$   $\mu$ M.



#### 4.14 Ensaio de atividade enzimática da plasmina

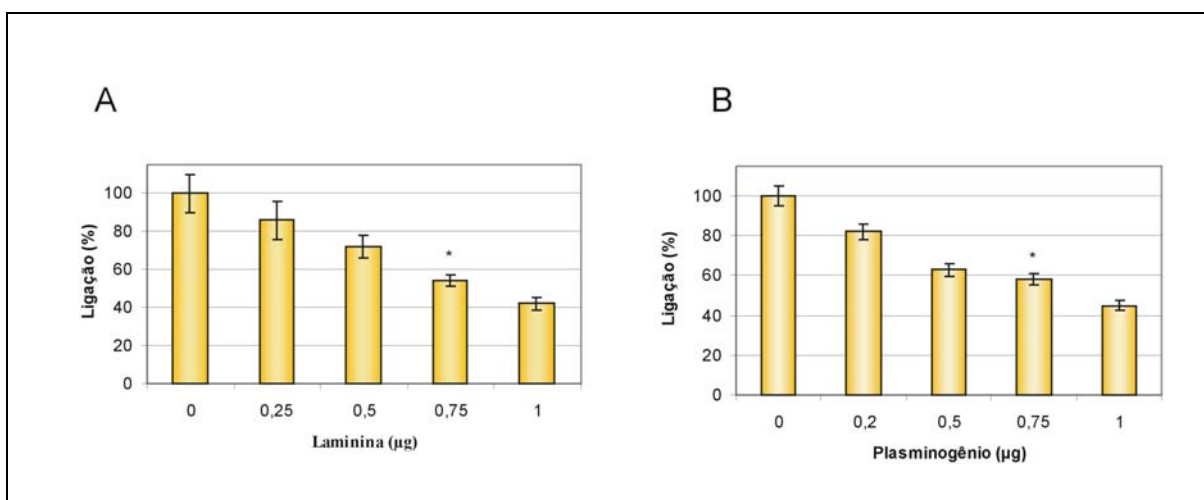
Plasmina enzimaticamente ativa é gerada pelo plasminogênio ligado à superfície de *L. interrogans* na presença do ativador (VIEIRA et al., 2009). Para verificar se o plasminogênio ligado à rLIC11469 gera atividade proteolítica, como já demonstrado anteriormente com outras proteínas recombinantes (VERMA et al., 2010; VIEIRA et al., 2010), placas de ELISA foram adsorvidas com rLIC11469, bloqueadas, e então incubadas com plasminogênio. O plasminogênio não ligado foi lavado, e foram adicionados o ativador de plasminogênio tipo tecidual (uPA) juntamente com o substrato cromogênico “D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride”, específico para plasmina. A reação ocorreu por 16 horas e a atividade da plasmina foi avaliada por absorbância no comprimento de onda de 405 nm. O plasminogênio ligado à rLIC11469 pode ser convertido em plasmina, como demonstrado indiretamente pela atividade proteolítica da plasmina gerada, que agiu sobre o substrato cromogênico (Figura 30). Os controles negativos, onde um dos componentes da reação (plasminogênio, uPA ou o substrato cromogênico) foi omitido, empregando rLIC11030 ou BSA, não mostraram atividade enzimática.



**Figura 30 - Geração de plasmina pelo plasminogênio ligado à rLIC11469.** PLG: plasminogênio. uPA: ativador do plasminogênio tipo uroquinase. S: substrato cromogênico específico para a plasmina. BSA foi empregado como controle negativo, assim como rLIC11030. Barras representam a absorbância a 405 nm, como a medida da degradação do substrato  $\pm$  o desvio padrão de quatro replicatas para cada grupo experimental e são representativas de dois experimentos independentes. Significância estatística em comparação ao BSA: \* $P < 0,003$ .

#### 4.15 Interferência da laminina na ligação do plasminogênio à rLIC11469

Devido ao fato de ambos laminina e plasminogênio exibirem ligação à rLIC11469, foi avaliado se esses componentes competem pelo mesmo sítio de ligação à rLIC11469 ou interferem de algum modo na interação. Os ensaios de ligação foram realizados na presença de concentrações crescentes de laminina (0 a 1  $\mu\text{g}$ ) ou plasminogênio (0 a 1  $\mu\text{g}$ ). Os resultados mostram que laminina (Figura 31A) e plasminogênio (Figura 31B) interferem na ligação à rLIC11469 de modo dose-dependente. A adição de laminina diminuiu a ligação do plasminogênio a rLIC1149, sendo a redução significativa com 0,75  $\mu\text{g}$  de laminina. Um comportamento similar foi observado quando concentrações crescentes de plasminogênio foram adicionadas à ligação laminina-rLIC11469, sugerindo que as moléculas competem pelo mesmo sítio de ligação na proteína recombinante.

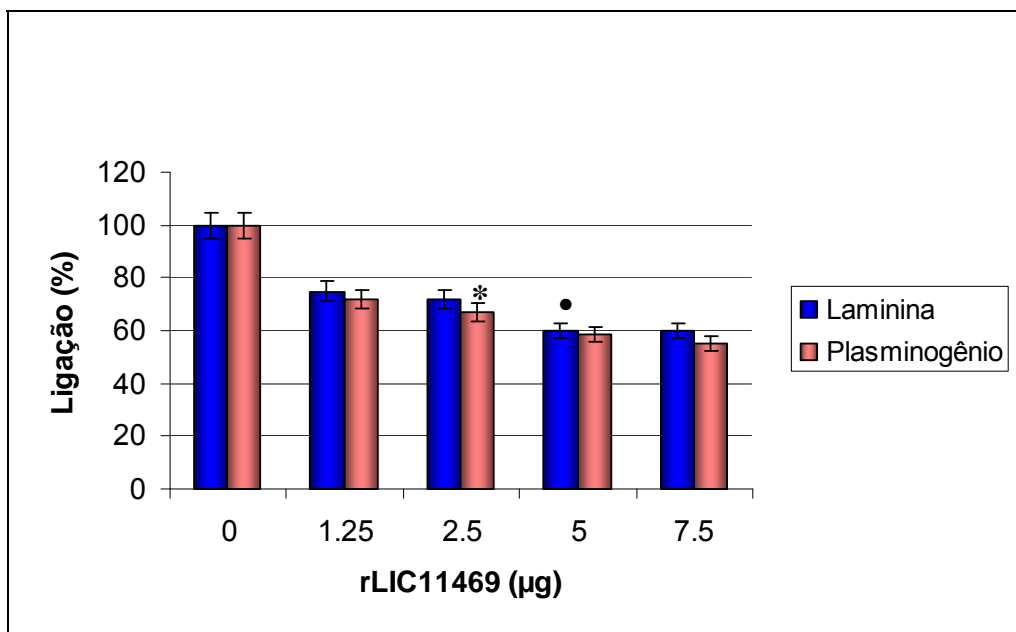


**Figura 31 - Laminina e plasminogênio competem na ligação à rLIC11469. A)** Ligação de rLIC11469 (1  $\mu\text{g}$ ) ao plasminogênio imobilizado (1  $\mu\text{g}$ ) foi realizada com a adição de concentrações crescentes de laminina (0 a 1  $\mu\text{M}$ ). **B)** Ligação de rLIC11469 (1  $\mu\text{g}$ ) à laminina imobilizada (1  $\mu\text{g}$ ) foi realizada com a adição de concentrações crescentes de plasminogênio (0 a 1  $\mu\text{M}$ ). A detecção da laminina ou plasminogênio ligado foi avaliada pela adição de anticorpos específicos. Barras representam a média dos valores de absorbância a 492 nm  $\pm$  o desvio padrão de quatro replicatas para cada grupo experimental e são representativas de dois experimentos independentes. Significância estatística em comparação ao controle positivo (sem adição de laminina ou plasminogênio):  $P < 0,05$  (\*).

#### **4.16 Inibição da ligação de leptospiros vivos à laminina ou plasminogênio pela rLIC11469**

Já foi demonstrado anteriormente que as proteínas recombinantes Lsa24/ (LfhA/LenA) (BARBOSA et al., 2006), Lsa63 (VIEIRA et al., 2010) e OmpL37 (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010) exibem um efeito inibitório na ligação de leptospiros à macromoléculas da ECM. Devido à isso, foi feito um experimento similar, baseado na técnica de ELISA, para avaliar o efeito de concentrações crescentes de rLIC11469 (0 a 7,5 µg) em inibir a aderência de leptospiros à laminina ou ao plasminogênio. Os resultados mostram que a adição de concentrações crescentes de rLIC11469 reduziram a ligação de leptospiros às moléculas de laminina e ao plasminogênio de forma dose-dependente (Figura 32). A redução do número de leptospiros ligadas ao plasminogênio foi significativa com 2,5 µg de rLIC11469, enquanto em relação à laminina a redução foi significativa a partir de 5 µg de rLIC11469.

Ou seja, o efeito inibitório foi moderado, porém estatisticamente significativo para ambos os componentes, e pode ser explicado pela existência de outras proteínas de *L. interrogans* que contribuem para a ligação à laminina ou plasminogênio (VIEIRA et al., 2010). Esses dados são similares aos obtidos com as proteínas de *Leptospira* Lsa24, Lsa63, LigA/LigB e OmpL37 (BARBOSA et al., 2006; CHOY et al., 2007; LIN et al., 2009b; PINNE; CHOY; HAAKE, 2010; VIEIRA et al., 2010).



**Figura 32 - Inibição da ligação de *L. interrogans* à laminina ou ao plasminogênio pela rLIC11469.** Laminina ou plasminogênio (1 µg) foram adsorvidos em placas de ELISA e incubados com concentrações crescentes de rLIC11469 (0 a 7,5 µg). Leptospiras vivas (100 µL/poço de  $4 \times 10^7$  *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20) foram adicionadas. Leptospiras não-ligadas foram lavadas e a quantificação das leptospiras ligadas foi realizada indiretamente por anticorpos anti-LipL32 produzidos em camundongo. Cada barra representa a média dos valores de absorbância a 492 nm  $\pm$  o desvio padrão de três replicatas. Dados representativos de dois experimentos independentes. Significância estatística em comparação ao controle positivo (sem adição de laminina ou plasminogênio):  $P < 0,009$  (\*) e  $P < 0,005$  (•).

#### 4.17 Avaliação do ensaio de imunoproteção em hamster

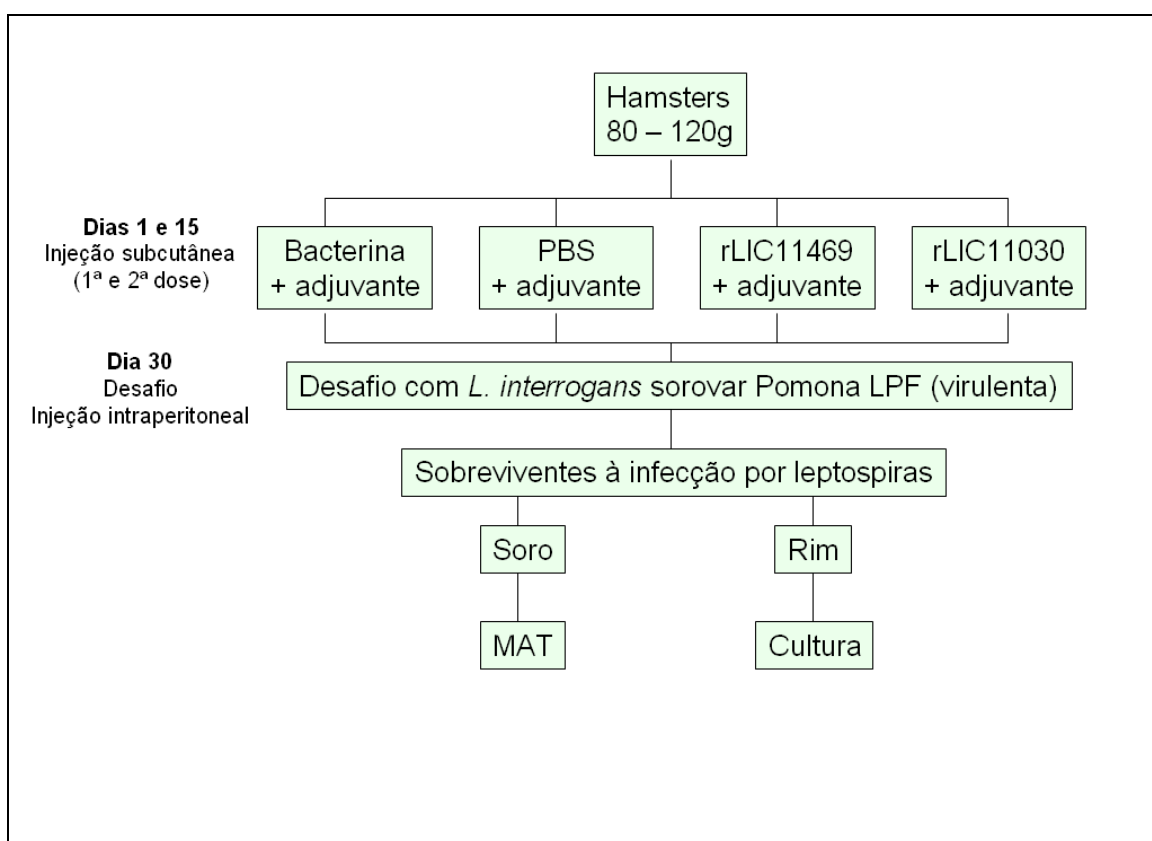
A identificação proteínas imunogênicas de *Leptospira* como candidatos vacinais tornou-se o principal foco na pesquisa sobre a leptospirose (HAAKE et al., 1998; HAAKE, 2000; MATSUNAGA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2010 ; PALANIAPPAN et al., 2002; SHANG; SUMMERS; HAAKE, 1996; VIEIRA et al., 2010). O LPS leptospiral tem sido extensivamente estudado, mas a eficiência do LPS na vacinação é limitada devido à especificidade determinada pelo sorovar (FAINE et al., 1999). Dessa forma, novas estratégias vacinais são direcionadas à busca de antígenos capazes de gerar proteção cruzada contra vários sorovares.

Com esse propósito, decidimos verificar se as proteínas recombinantes em estudo conferem resposta imunológica protetora contra infecção de *L. interrogans* sorovar Pomona (cepa LPF). Para isso, hamsters foram imunizados com 50 µg de

proteína recombinante, em duas doses com intervalo de 15 dias entre cada dose, e desafiados no 30º dia com uma carga de leptospiras equivalente à DL<sub>50</sub>.

O uso de modelos animais é indispensável no entendimento da biologia, transmissão, colonização do hospedeiro e patogênese de *Leptospira*. Dentre os modelos animais estabelecidos para leptospirose, hamsters são comumente usados por serem altamente suscetíveis a infecção leptospiral, exibindo características que mimetizam a infecção severa em humanos (HAAKE, 2006).

Foram realizados dois ensaios independentes para cada proteína recombinante (totalizando quatro ensaios), empregando as proteínas rLIC11030, rLIC11469 e, como controle de proteção, uma vacina de bactéria inativada por calor (bacterina de *L. interrogans* sorovar Pomona LPF). Hamsters recém desmamados foram distribuídos em grupos de 8-10 animais conforme figura 33.



**Figura 33 – Esquema simplificado dos ensaios de imunoproteção.**

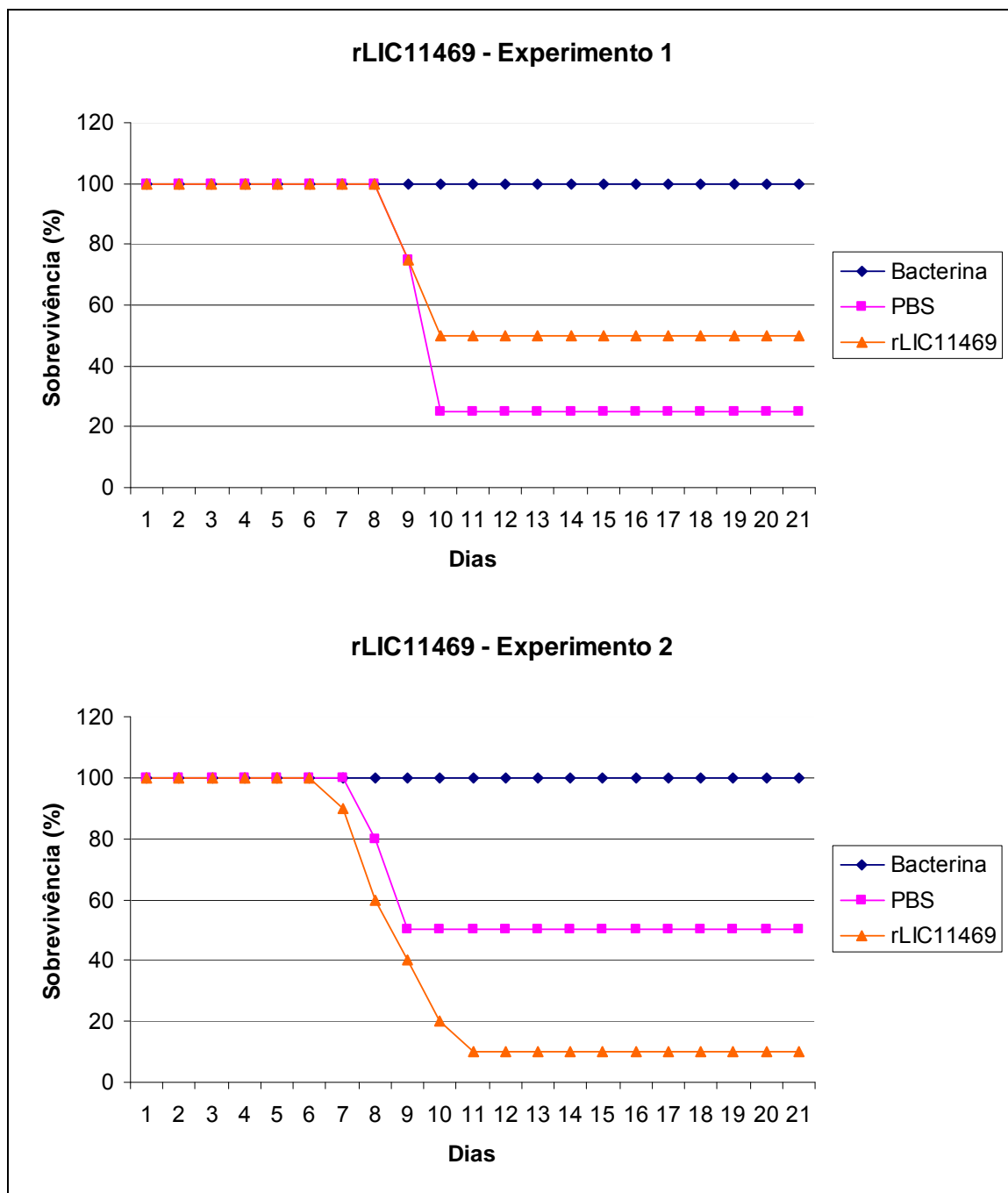
Fonte: Modificado de Atzingen, 2009.

Foram avaliados os soros de animais após a 2ª imunização, e sobreviventes após o desafio, sendo a resposta humoral acompanhada por ELISA. Os títulos obtidos após imunização com rLIC11469 foram maiores em comparação à

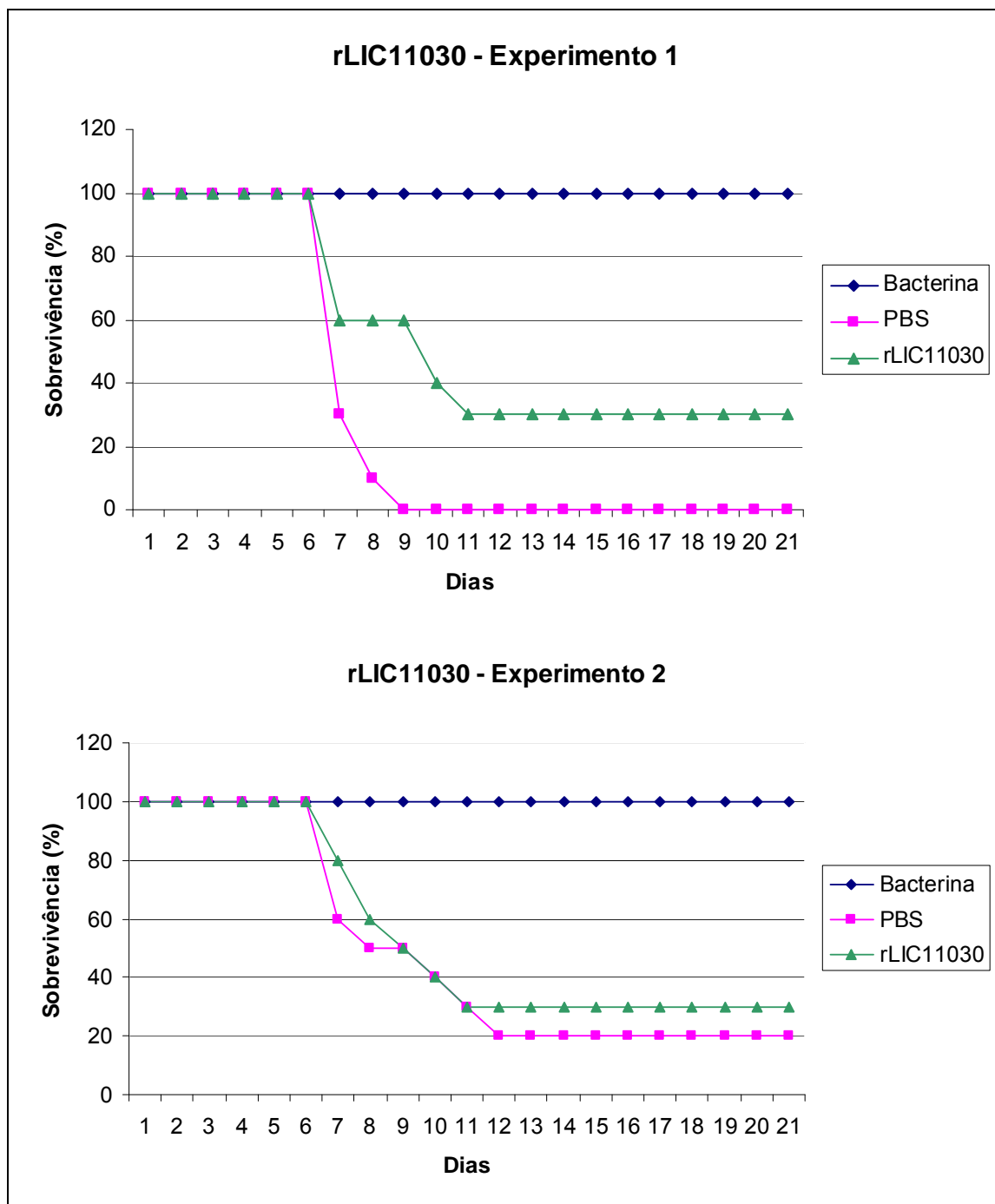
rLIC11030, variando de 1:400 a 1:1.600, enquanto os títulos de anticorpos conferidos pela imunização com rLIC11030 variaram entre 1:100 a 1:400.

Os hamsters foram infectados com cerca de  $1,8 \times 10^6$  (experimentos feitos com rLIC11030) ou  $2 \times 10^5$  (experimentos feitos com rLIC11469) *L. interrogans* sorovar Pomona (cepa LPF) por via intraperitoneal e acompanhados diariamente por 21 dias. As figuras 34 e 35 apresentam as curvas de sobrevivência obtidas nos dois experimentos de desafio empregando cada um dos antígenos teste.

Pudemos observar que apenas no primeiro experimento a sobrevivência conferida pela vacina com a proteína recombinante rLIC11469 foi maior em comparação ao grupo PBS, porém não foi estatisticamente significativa, enquanto nos dois experimentos empregando rLIC11030 a proteção conferida foi superior ao grupo PBS e significativa. Esses problemas encontrados empregando a rLIC11469 ilustram bem algumas dificuldades encontradas em reproduzir os experimentos de desafio e também em relação aos grupos controle PBS, que muitas vezes têm um grande número de sobreviventes, o que não gera significância estatística. Problemas semelhantes foram encontrados em um estudo investigando a proteção conferida a gerbos (*Meriones unguiculatus*) após imunização com adenovírus recombinante expressando LipL32 e desafio contra *L. interrogans* sorovar Canicola. Embora a proteção conferida tenha sido significativa, 50% dos animais controle sobreviveram após o desafio (BRANGER et al., 2001).



**Figura 34 - Sobrevivência dos hamsters imunizados com a proteína recombinante rLIC11469 e desafiados com *L. interrogans* sorovar Pomona virulenta.** Os animais foram desafiados com  $2 \times 10^5$  células em PBS duas semanas após o término da imunização. Os animais foram monitorados quanto à morbidade por 21 dias.



**Figura 35 - Sobrevivência dos hamsters imunizados com a proteína recombinante rLIC11030 e desafiados com *L. interrogans* sorovar Pomona virulenta.** Os animais foram desafiados com  $1,8 \times 10^6$  células em PBS duas semanas após o término da imunização. Os animais foram monitorados quanto à morbidade por 21 dias.

Os animais sobreviventes foram sacrificados, e seus rins coletados para cultura e isolamento de leptospiras. A proteção conferida pela rLIC11469 não foi esterilizante, uma vez que todos os animais sobreviventes continham leptospiras em seus rins; de forma semelhante, nos animais sobreviventes que foram imunizados



com rLIC11030, havia presença de leptospiras nos rins de um animal (de um total de três), nos dois experimentos de desafio. Em contrapartida, a proteção conferida pelos animais vacinados com bacterina foi esterilizante, visto que não foram encontradas leptospiras nos rins desses animais.

Dados semelhantes foram encontrados por Yan et al. (2010) em desafio utilizando proteínas OmpA-like, uma vez que as proteínas testadas por esse grupo não conferiram imunidade esterilizante em nenhum animal sobrevivente (YAN et al., 2010).

Os soros dos hamsters também foram avaliados por MAT. Nos grupos vacinados com bacterina, todos os animais foram MAT negativos, enquanto nos grupos vacinados com os antígenos teste, todos os animais sobreviventes foram positivos com títulos entre 1:200 e 1:400.

Na Tabela 4 estão apresentados de forma resumida os dados de proteção conferida pelos antígenos em estudo nesses dois experimentos. A fim de comparar os grupos vacinados com o grupo controle (PBS), foi realizada uma análise de significância estatística com auxílio do programa GraphPad Prism versão 3.00, utilizando o método Kaplan–Meier (KAPLAN e MEIER, 1958). O valor de *P* de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Esse resultado demonstra que a proteção conferida pela proteína rLIC11469 não foi significativa, enquanto proteção conferida pela proteína rLIC11030 foi significativa apenas no primeiro experimento de desafio. Todos os experimentos podem ser considerados válidos, pois a proteção conferida pela bacterina foi significativa em relação ao PBS nos quatro experimentos.

**Tabela 4 - Proteção conferida através de imunização com proteína recombinante contra desafio letal em hamster.**

<b>Desafio rLIC11469</b>				
<b>Vacina</b>	<b>% Proteção (sobreviventes / total)</b>			
	<b>Experimento 1</b>	<b>Experimento 2</b>	<b>Média</b>	<b>Análise estatística</b>
Bacterina	100% (8/8)	100% (10/10)	100%	$P < 0,003$
PBS	25% (2/8)	50% (5/10)	37,5%	--
rLIC11469	50% (4/8)	1/10 (10%)	30%	NS
<b>Desafio rLIC11030</b>				
<b>Vacina</b>	<b>% Proteção (sobreviventes / total)</b>			
	<b>Experimento 1</b>	<b>Experimento 2</b>	<b>Média</b>	<b>Análise estatística</b>
Bacterina	100% (10/10)	100% (10/10)	100%	$P < 0,05$
PBS	0% (0/10)	2/10 (20%)	10%	--
rLIC11030	30% (3/10)	30% (3/10)	30%	$P < 0,05$ (1° exp.) NS (2° exp.)

NOTA: Análise de significância estatística realizada. As análises estatísticas foram feitas utilizando o método Kaplan–Meier (KAPLAN e MEIER, 1958). O valor de  $P$  de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. NS: diferença não significativa.

Apesar desses dados estatísticos, a proteção conferida pela rLIC11030 deve ser considerada apenas parcial, visto que é uma porcentagem baixa, ao passo que a rLIC11469 pode ser considerada mais promissora, já que apresentou proteção de 50% em um dos experimentos, e seguiu a mesma tendência em ambos (ou seja, os animais começaram a morrer por volta do dia 10 nos dois experimentos). Além disso, a rLIC11469 possui ainda a vantagem de ser amplamente conservada, sendo presente em 11 sorovares causadores de leptospirose mais prevalentes no Brasil, devendo assim ser novamente investigada em ensaios de desafio.

Dessa forma, novos estudos são necessários; algumas alterações poderiam ser feitas nos testes, por exemplo o aumento da concentração de proteína de 50 para 100  $\mu\text{g}$ , e a administração de uma terceira dose, anterior ao desafio com leptospirosas virulentas. Adicionalmente, seria interessante avaliar esses dois antígenos em uma mesma dose de vacina, e/ou em conjunto com outro antígeno promissor já conhecido para avaliarmos se ocorre efeito sinérgico.

## 5 CONCLUSÕES

Os genes foram inicialmente clonados em vetor pGEM-T Easy e, em seguida, subclonados no vetor de expressão pAE. O sequenciamento confirmou a presença dos genes sem peptídeo sinal no vetor, assim como a introdução correta na janela de leitura.

Após verificação da conservação dos genes em espécies e sorovares patogênicos de *Leptospira* e também em uma espécie saprofítica *L. biflexa*, pode-se afirmar que dentre os genes testados LIC11469 é o mais conservado, já que foi detectado em todas as amostras testadas. Adicionalmente, os ensaios de expressão das proteínas codificadas pelos genes LIC11469 e LIC11030 mostraram que a LIC11469 é expressa em todos os sorovares testados, sendo a LIC11030 presente em três sorovares de *L. interrogans*.

Em relação à expressão das proteínas recombinantes, as proteínas correspondentes aos genes LIC11030 e LIC11469 foram ambas obtidas sob forma insolúvel, sendo solubilizadas utilizando tampão contendo ureia. Os genes LIC10411, LIC12891, LIC10827 e LIC13305 não foram expressos em nenhuma das condições testadas, como foi confirmado pelo ensaio de *Immunoblotting* com anticorpo anti-poli-histidina.

Por meio do ensaio de difração circular, pode-se constatar que ambas as proteínas rLIC11469 e rLIC11030 apresentam estrutura secundária.

A imunização de camundongos resultou em altos títulos de anticorpos policlonais após a terceira imunização, com especificidade contra as proteínas recombinantes, como foi confirmado por *Immunoblotting*.

As proteínas recombinantes foram reconhecidas por anticorpos IgG e IgM de amostras de soros de pacientes diagnosticados com leptospirose, a proteína rLIC11469 apresentou a maior frequência de respondedores para anticorpos IgG e IgM em soros da fase inicial da doença (MAT negativo), sugerindo a expressão dessa proteína durante a infecção.

Os ensaios de adesão a proteínas de matriz extracelular revelaram que a rLIC11469 liga-se a laminina de forma dose-dependente, sendo a ligação saturável com cerca de 8  $\mu$ M de proteína recombinante. Porém essa interação entre a proteína recombinante e o componente de matriz não é dependente dos

carboidratos da laminina, como foi demonstrado pelo tratamento da laminina com metaperiodato.

A proteína rLIC11469 também liga-se ao plasminogênio, de forma dose-dependente e saturável; além disso, o plasminogênio ligado à rLIC11469, na presença do ativador específico, pode ser convertido em plasmina enzimaticamente ativa. Esses dados sugerem que a bactéria, uma vez ligada ao plasminogênio através de rLIC11469 (além de outras proteínas), pode fazer uso de sua conversão em plasmina como estratégia para penetração tecidual e invasão, sendo esse um provável fator de virulência.

Observou-se também que ambos os componentes, laminina e plasminogênio, parecem competir pelo sítio de ligação à rLIC11469. Adicionalmente, concentrações crescentes de rLIC11469 inibem a ligação de leptospiros vivos à esses componentes.

Finalmente, ensaios de imunização e desafio demonstraram que a proteína rLIC11030 conferiu proteção parcial contra infecção letal de *L. interrogans* em hamsters, enquanto a proteção conferida pela rLIC11469 não foi estatisticamente significativa, mas deverá ser melhor investigada, já que essa proteína conferiu proteção alta em um dos experimentos e é amplamente conservada em sorovares patogênicos causadores da doença no Brasil.

Ambas as proteínas haviam sido identificadas, através de sequenciamento genômico, como prováveis proteínas de membrana externa sem função conhecida. Por meio de ensaios de localização celular, pudemos demonstrar que as proteínas codificadas pelos genes LIC11469 e LIC11030 são de fato proteínas de superfície. Além disso, conseguimos caracterizar a proteína correspondente ao gene LIC11469 como uma proteína de dupla adesão (laminina e plasminogênio), que provavelmente tem um papel na patogênese da leptospirose. Os dados apresentados nesse trabalho foram organizados em um manuscrito, conforme ANEXO C.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.
- ADU-BOBIE, J. et al. Two years into reverse vaccinology. **Vaccine**, v. 21, p. 605-610, 2003.
- AHMED, N. et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. **Annals of Clinical Microbiology And Antimicrobials**, v. 5, p. 28, 2006.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ATZINGEN, M. V. et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 70, 2008.
- ATZINGEN, M. V. **Expressão, purificação e caracterização de proteínas de superfície de Leptospira interrogans**. 2009. 166 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ATZINGEN, M. V. et al. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. **The Journal of Infection**, v. 59, p. 264-276, 2009.
- BARBOSA, A. S. et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 6356-6364, 2006.
- BARBOSA, A. S. et al. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 1137-1143, 2009.
- BAROCCHI, M. A. et al. Identification of new repetitive element in Leptospira interrogans serovar copenhageni and its application to PCR-based differentiation of Leptospira serogroups. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 191-195, 2001.
- 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**, v. 179, p. 4403-4406, 1997.

---

<sup>1</sup> De acordo com:

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

BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 757-771, 2003.

BLOM, A. M. Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 978-982, 2002.

BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis in bovine urine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 1001-1003, 1989a.

BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis on type hardjo-bovis infection of cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 2004-2008, 1989b.

BRANGER, C. et al. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6831-6838, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BREINER, D. D. et al. *Leptospira interrogans* binds to human cell surface receptors including proteoglycans. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 5528-5536, 2009.

BROWN, P. D. et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 43, p. 110-114, 1995.

BROWN, P. D. et al. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 581-586, 2003.

BRYKSIN, A. V. et al. BmpA is a surface-exposed outer-membrane protein of *Borrelia burgdorferi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 309, p. 77-83, 2010.

BULACH, D. M. et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 14560-14565, 2006.

CAMERON, C. E. Identification of a *Treponema pallidum* laminin-binding protein. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 2525-2533, 2003.

CARVALHO, E. et al. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. **FEBS Letters**, v. 17, p. 1381-1385, 2009.

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

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

CICERONI, L. et al. Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. **European Journal of Epidemiology**, v. 16, p. 79-86, 2000.

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

COLEMAN, J. L.; ROEMER, E. J.; BENACH, J. L. Plasmin-coated borrelia Burgdorferi degrades soluble and insoluble components of the mammalian extracellular matrix. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 3929-3936, 1999.

COX, D. L. et al. Surface immunolabeling and consensus computational framework to identify candidate rare outer membrane proteins of *Treponema pallidum*. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 5178-5194, 2010.

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

CULLEN, P. A. et al. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 2414-2421, 2003.

CULLEN, P. et al. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 4853-4863, 2005.

CUMBERLAND, P.; EVERARD, C. O.; LEVETT, P. N. Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 731-734, 1999.

DONG, H. et al. Characterization of the ompL1 gene of pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 223, 2008.

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

FINN, R. D. et al. Pfam: clans, web tools and services. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 247-251, 2006.

FONSECA, A. et al. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. **The Journal of Infection**, v. 52, p. 15-22, 2006.

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

GASTEIGER, J. Chemoinformatics: a new field with a long tradition. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 57-64, 2006.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2876-2890, 2006.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Leptospira: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular Microbiology**, v. 77, p. 805-814, 2010.

HAAKE, D. A. et al. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 1579-1587, 1998.

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

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

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

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4936-4945, 2002.

HAAKE, D. A. Hamster model of leptospirosis. In: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780471729259.mc12e02s02/abstract>. **urrent Protocols in Microbiology**. New Jersey, USA. John Wiley & Sons, Inc, 2006. Online ISBN: 9780471729259. Cap. 12, Unit 12E 12.

HANAHAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, p. 557-580, 1983.

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

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

HOLZWARTH, G. E DOTY, P. The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, p. 218-228, 1965.

JACKSON, L. A. et al. Outbreak of leptospirosis associated with swimming. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 12, p. 48-54, 1993.



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

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

KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, v. 354, p.820-825, 1999.

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

KOBAYASHI, Y. Clinical observation and treatment of leptospirosis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 7, p. 59-68, 2001.

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

KOIZUMI, N. et al. A case of leptospirosis diagnosed early by flaB-PCR. **Kansenshogaku Zasshi**, v. 77, p. 627-630, 2003.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, p. 1545-1552, 2004.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 51, p. 210-214, 2005a.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Diagnostic tests: Leptospira. **Nippon Rinsho**, v. 7, p. 214-216, 2005b.

KOSITANONT, U. et al. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic Leptospira spp. by multiplex polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p. 117-122, 2007.

LAHTEENMAKI, K.; KUUSELA, P.; KORHONEN, T. K. Bacterial plasminogen activators and receptors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 531-552, 2001.

LETUNIC, I. et al. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 257-260, 2006.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, 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**, v. 36, p. 447-452, 2003.

LEVETT, P. N. et al. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 671-673, 2006.

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

LIN, Y. P. et al. A novel fibronectin type III module binding motif identified on C-terminus of *Leptospira* immunoglobulin-like protein, LigB. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 389, p. 57-62, 2009a.

LIN, Y. P. et al. Repeated domains of *Leptospira* immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 19380-19391, 2009b.

LJUNGH, A.; MORAN, A. P.; WADSTROM, T. Interactions of bacterial adhesins with extracellular matrix and plasma proteins: pathogenic implications and therapeutic possibilities. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 16, p. 117-126, 1996.

LONGHI, M. T. et al. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1275-1282, 2009.

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

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

MARTINEZ, R. et al. [Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba]. **Revista Panamericana de Salud Publica = Pan American Journal of Public Health**, v. 15, p. 249-255, 2004.

MATSUNAGA, J. et al. Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 323-334, 2002.

MAYER-SCHOLL, A. et al. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, p. 112-114, 2010.

MCBRIDE, A. J. et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, p. 376-386, 2005.

MEDINI, D. et al. Microbiology in the post-genomic era. **Nature Reviews**, v. 6, p. 419-430, 2008.

MERI, T. et al. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospire. **Microbial Pathogenesis**, v. 39, p. 139-147, 2005.

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 281-285, 1995.

MERIEN, F. et al. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **FEMS Microbiology Letters**, v. 185, p. 17-22, 2000.

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

MONTIGIANI, S. et al. Genomic approach for analysis of surface proteins in *Chlamydia pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 368-379, 2002.

MORGAN, J. et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 1593-1599, 2002.

MORRISSEY, J. A. et al. Conservation, surface exposure, and in vivo expression of the Frp family of iron-regulated cell wall proteins in *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 2399-2407, 2002.

MURRAY, G. L. et al. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. **Molecular Microbiology**, v. 78, p. 701-709, 2010.

MURRAY, G. L. et al. *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 10, p. 791-797, 2008.

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

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

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

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

NALLY, J. E. et al. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 766-773, 2007.

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

NASCIMENTO, A. L. et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica**, v. 37, p. 459-477, 2004b.

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

OLIVEIRA, T. R. et al. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. **Microbes And Infection / Institut Pasteur**, v. 12, p. 207-217, 2010.

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

PALANIAPPAN, R. U. et al. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 5924-5930, 2002.

PALANIAPPAN, R. U.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 20, p. 284-292, 2007.

PATHIRANA, R. D. et al. Characterization of proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis*. **Microbiology**, v. 152, p. 2381-2394, 2006.

PEROLAT, P. et al. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 851-858, 1998.

PERRET, P. C. et al. [Risk factors and frequency of positive antibodies for leptospirosis in a sub urban population near Santiago]. **Revista Medica de Chile**, v. 133, p. 426-431, 2005.

PICARDEAU, M.; BRENOT, A.; SAINT GIRONS, I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. **Molecular Microbiology**, v. 40, p. 189-199, 2001.

PICARDEAU, M. et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS ONE**, v. 3, p. 1607, 2008.

PINNE, M.; CHOY, H. A.; HAAKE, D. A. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 815, 2010.

PINNE, M.; HAAKE, D. A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira* interrogans. **PLoS ONE**, v. 4, p. 6071, 2009.

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

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 2, p. 1265-1276, 2000.

PROBERT, W. S.; ALLSUP, K. M.; LEFEBVRE, R. B. Identification and characterization of a surface-exposed, 66-kilodalton protein from *Borrelia burgdorferi*. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 1933-1939, 1995.

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

RAMOS, C. R. et al. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica**, v. 37, p. 1103-1109, 2004.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 445-450, 2000.

REID, S. D. et al. Multilocus analysis of extracellular putative virulence proteins made by group A *Streptococcus*: population genetics, human serologic response, and gene transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 7552-7557, 2001.

REID, S. D. et al. Postgenomic analysis of four novel antigens of group a streptococcus: growth phase-dependent gene transcription and human serologic response. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 6316-6324, 2002.

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

RISTOW, P. et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathogens**, v. 3, p. 97, 2007.

RISTOW, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, p. 1309-1317, 2008.

ROSS, B. C. et al. Identification of vaccine candidate antigens from a genomic analysis of *Porphyromonas gingivalis*. **Vaccine**, v. 19, p. 4135-4142, 2001.

SAENGJARUK, P. et al. Diagnosis of human leptospirosis by monoclonal antibody-based antigen detection in urine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 480-489, 2002.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

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

SCHULTZ, J. et al. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 5857-5864, 1998.

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

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

SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R. Post-genomic vaccine development. **FEBS Letters**, v. 580, p. 2985-2992, 2006.

SHANG, E. S. et al. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 3174-3181, 1995.

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**, v. 64, p. 2322-2330, 1996.

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

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

STERN, E. J. et al. Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 843-849, 2005.

STEVENSON, B. et al. Leptospira interrogans endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. **PLoS ONE**, v. 2, p. 1188, 2007.

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

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

TOYOKAWA, T.; OHNISHI, M.; KOIZUMI, N. Diagnosis of acute leptospirosis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 9, p. 111-121, 2011.

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

TULSIANI, S. M. et al. Emerging tropical diseases in Australia. Part 1. Leptospirosis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 104, p. 543-556, 2010.

TURNER, L. H. Leptospirosis. 3. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, p. 623-646, 1970.

VERMA, A. et al. Leptospiral endostatin-like protein A (LenA) is a bacterial cell-surface receptor for human plasminogen. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 2053-2059, 2010.

VERMA, A. et al. LfhA, a novel factor H-binding protein of Leptospira interrogans. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 2659-2666, 2006.

VICTORIANO, A. F. et al. Leptospirosis in the Asia Pacific region. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, p. 147, 2009.

VIEIRA, M. L. et al. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen Leptospira interrogans. **PLoS ONE**, v. 5, p. 11259, 2010.

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

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

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, p. 527-538, 2001.

WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nature Immunology**, v. 2, p. 346-352, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. Geneva: WHO, 2003. ISBN 9241545895. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002.23.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf)>. Acesso em: 25 Jul 2011.

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

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

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

YAN, W. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 11, p. 230-237, 2008.

YAN, Y. et al. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to leptospira. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 66, p. 224-230, 2003.



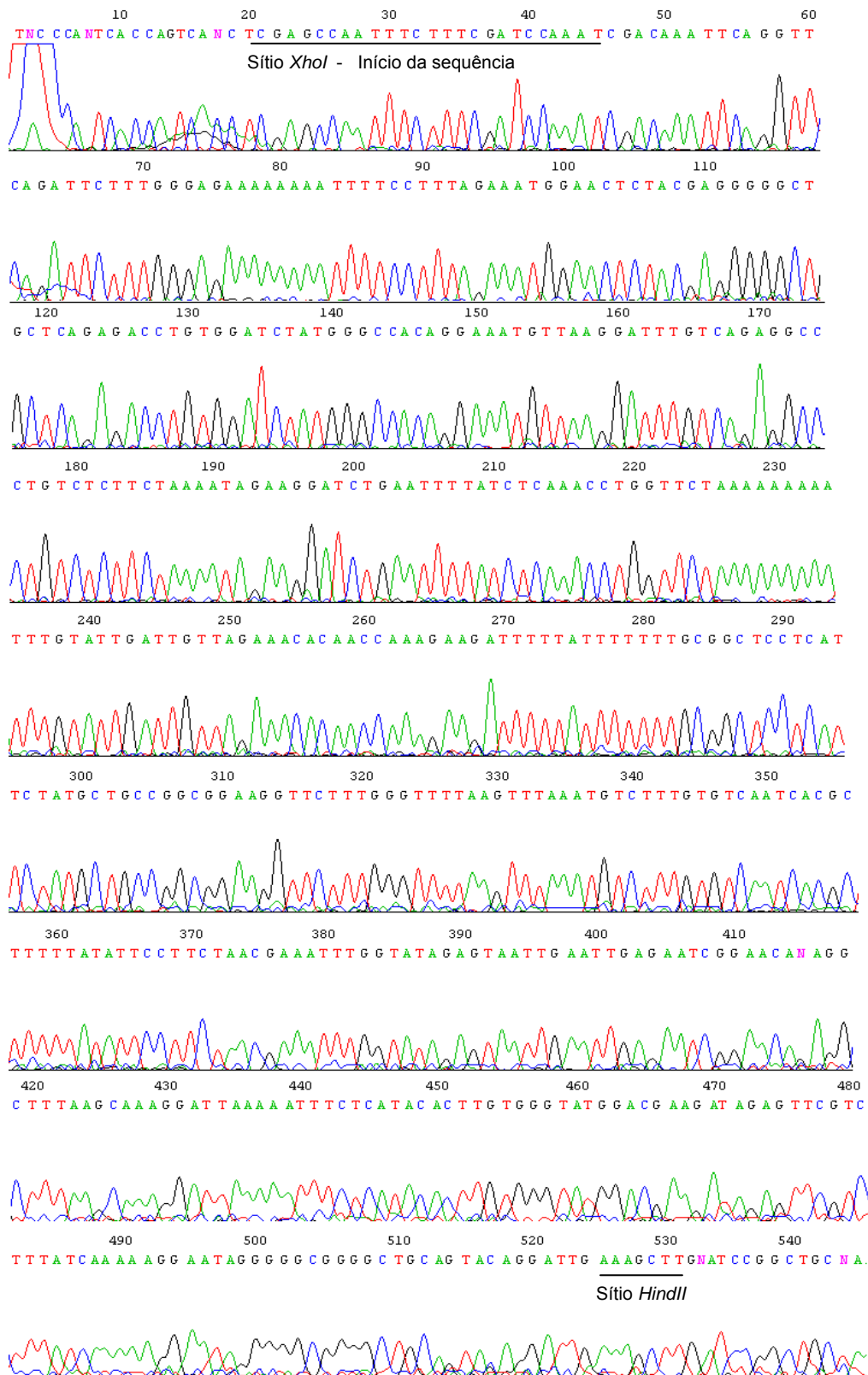
## ANEXOS

## ANEXO A - Soros humanos empregados nos imunoensaios

Paciente	MAT	Paciente	MAT
1	Negativo Ictero/Copenhageni 1/6.400	21	Negativo Copenhageni 1/1.600
2	Negativo Autumnalis 1/6.400	22	Negativo Ictero/Copenhageni 1/200
3	Negativo Ictero 1/800	23	Negativo Ictero 1/3.200
4	Negativo Copenhageni 1/3.200	24	Negativo Cynoptery 1/400
5	Negativo Ictero 1/6.400	25	Negativo Ictero/Copenhageni 1/1.600
6	Negativo Ictero 1/3.200	26	Negativo Australis 1/800
7	Negativo Copenhageni 1/800	27	Negativo Ictero/Copenhageni 1/3.200
8	Negativo Copenhageni 1/3.200	28	Negativo Canicola 1/400
9	Negativo Ictero 1/1.600	29	Negativo Ictero 1/12.800
10	Negativo Ictero/Copenhageni 1/3.200	30	Negativo Ictero 1/6.400
11	Negativo Autumnalis 1/800	31	Negativo Ictero 1/6.400
12	Negativo Copenhageni 1/1.600	32	Negativo Ictero 1/800
13	Negativo Inconclusivo 1/6.400	33	Negativo Canicola 1/800
14	Negativo Autumnalis 1/800	34	Negativo Copenhageni 1/3.200
15	Negativo Tarassovi	35	Negativo Ictero/Copenhageni 1/1.600
16	Negativo Inconclusivo 1/400	36	Negativo Ictero/Copenhageni 1/800
17	Negativo Ictero 1/1.600	37	Negativo Ictero/Copenhageni 1/1.600
18	Negativo Inconclusivo 1/800	38	Negativo Ictero/Copenhageni 1/3.200
19	Negativo Copenhageni 1/3.200	39	Negativo Ictero/Copenhageni 1/3.200
20	Negativo Ictero 1/3.200	40	Negativo Ictero/Cynoptery 1/12.800

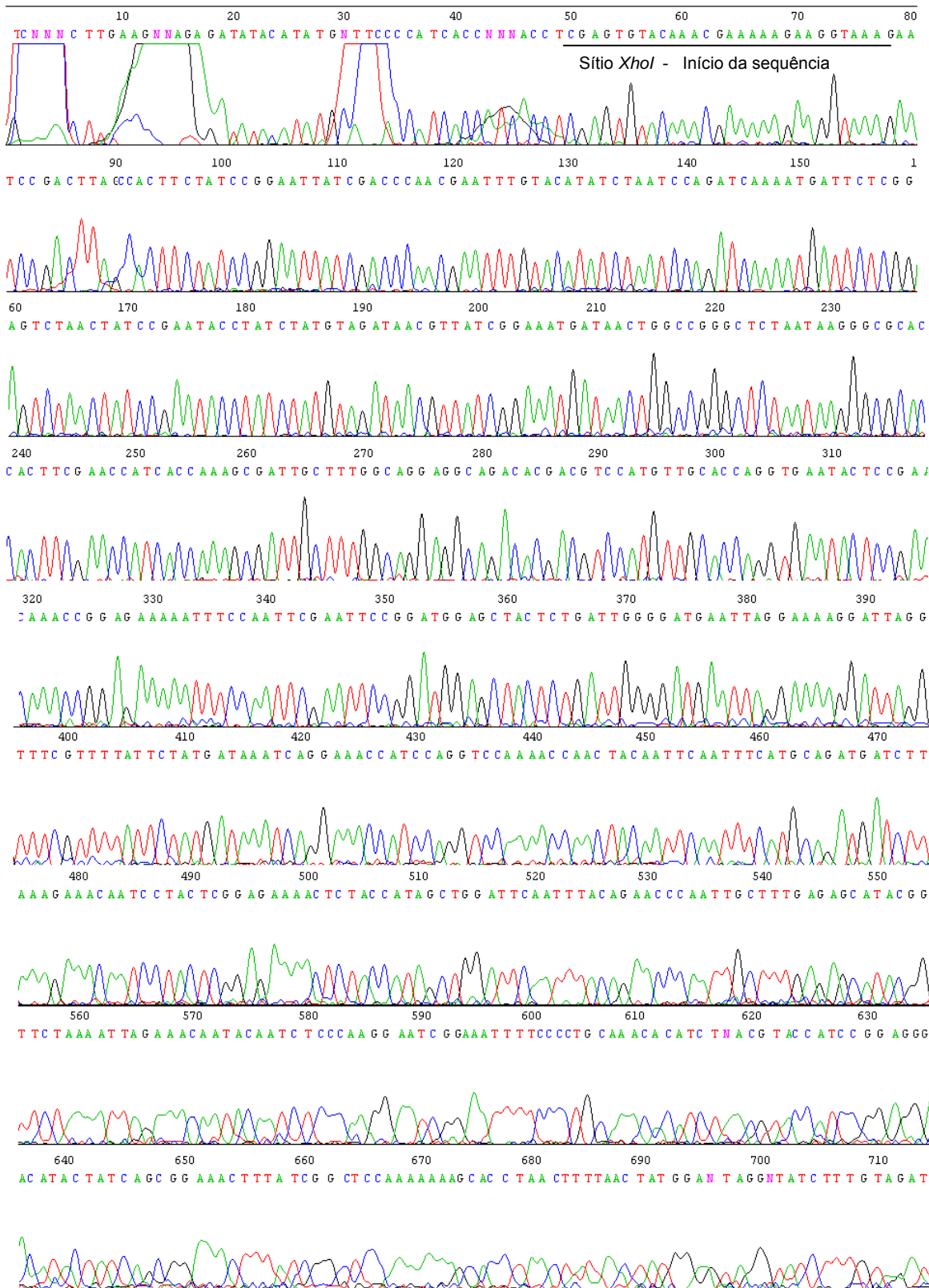
## ANEXO B - Cromatogramas dos sequenciamentos das construções no pAE contendo os insertos de DNA dos genes selecionados

### LIC11469



## ANEXO B - Continuação

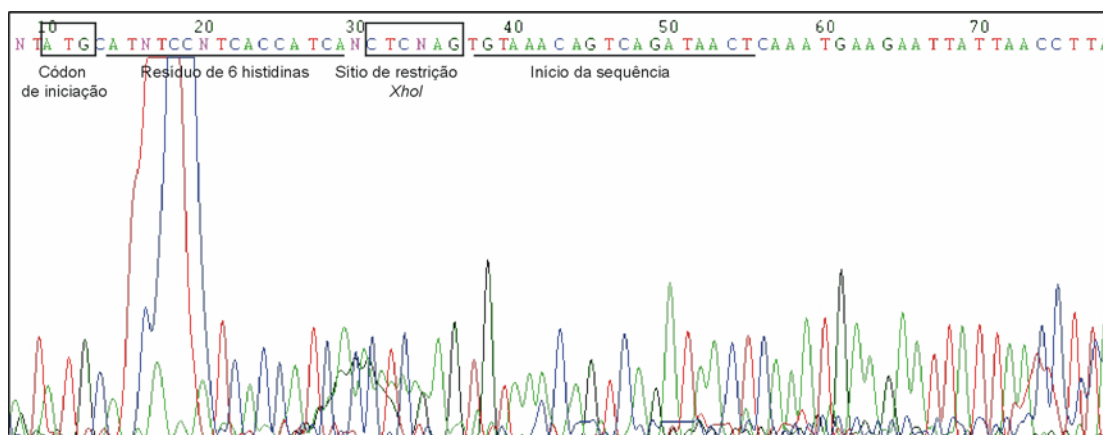
### LIC11030



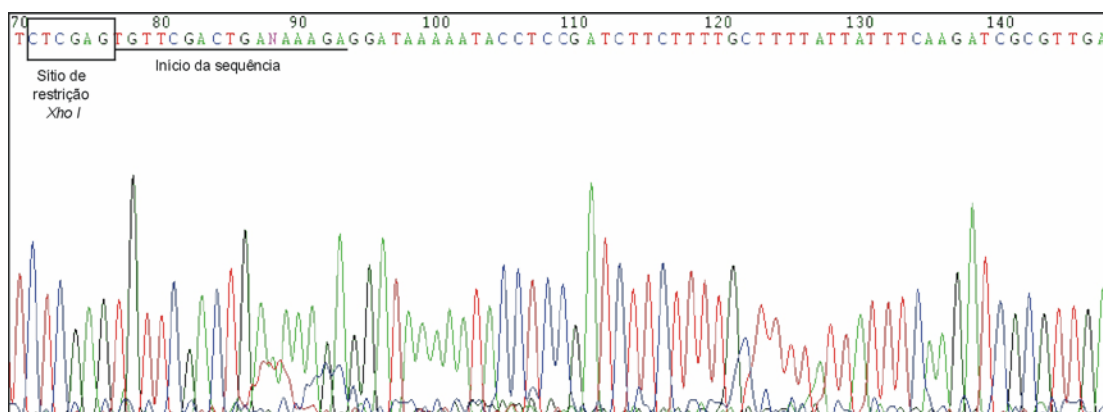
Continua

## ANEXO B - Continuação

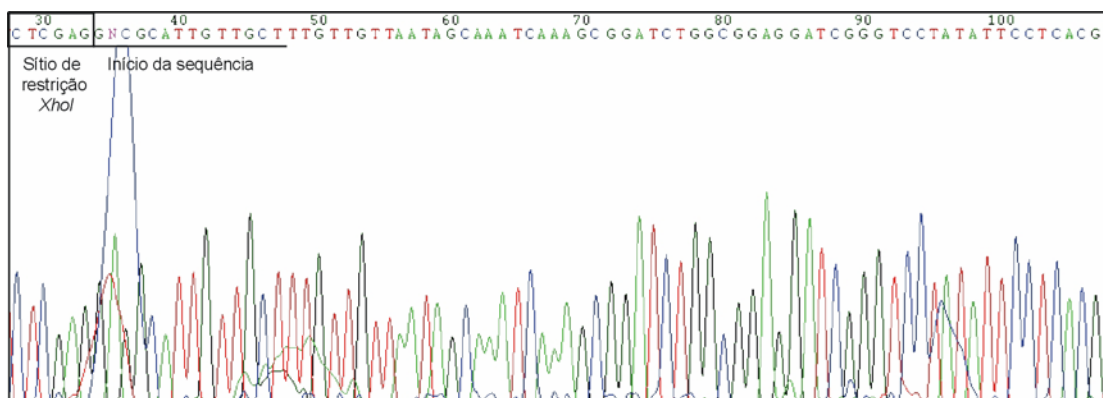
## LIC10827



## LIC13305



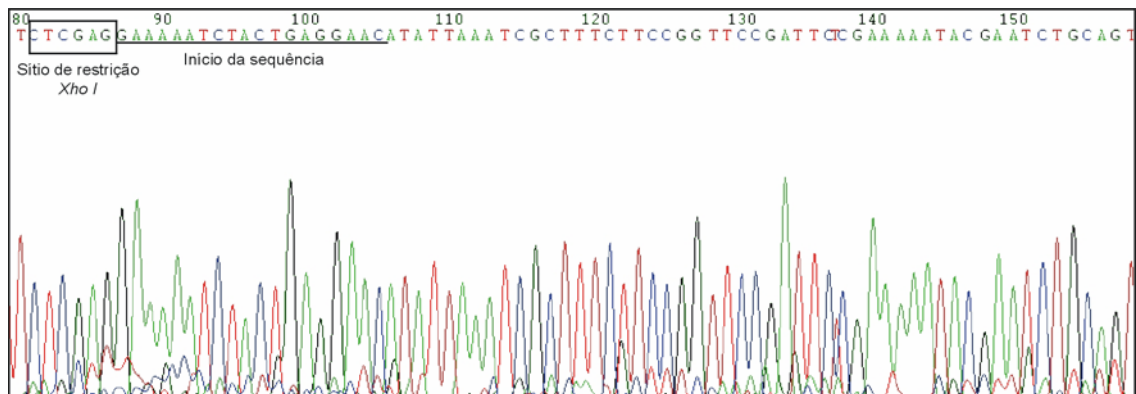
## LIC12891



Continua

## ANEXO B - Conclusão

### LIC10411



## ANEXO C - MANUSCRITO: The novel leptospiral surface adhesin, Lsa20, binds laminin, human plasminogen and is probably expressed during infection

Renata Siqueira Mendes<sup>1,2</sup>, Marina Von Atzingen<sup>1</sup>, Zenaide Maria de Moraes<sup>3</sup>, Amane Paldes Gonçalves<sup>3</sup>, Solange M. T. Serrano<sup>4</sup>, Amanda F. Asega<sup>4</sup>, Eliete Caló Romero<sup>5</sup>, Silvio Arruda Vasconcelos<sup>3</sup> and Ana Lucia Tabet O. Nascimento<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900, São Paulo, SP, Brazil; <sup>2</sup>Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil; <sup>3</sup>Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, 05508-270, São Paulo, SP, Brazil. <sup>4</sup> Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada-CAT/cepid, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil; <sup>5</sup>Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, Avenida Dr. Arnaldo, 355, 01246-902, Sao Paulo, Brazil.

### ABSTRACT

Leptospirosis is an emerging infectious disease caused by pathogenic species of *Leptospira*. In this work, we report the cloning, expression, purification and characterization of two predicted leptospiral outer membrane proteins, LIC11469, and LIC11030. The LIC11469 protein is well conserved among leptospiral strains while LIC11030 was identified only in *L. interrogans*. We confirmed by surface proteolysis of intact leptospire with proteinase K that these proteins are most likely new surface leptospiral proteins. The recombinant proteins were evaluated for their capacity to attach to extracellular matrix (ECM) components and to plasminogen. The leptospiral protein encoded by LIC11469, named Lsa20 (Leptospiral surface adhesin of 20 kDa), binds to laminin and to plasminogen. The binding with both components was not detected when Lsa20 was previously denatured or blocked with anti-Lsa20 antibodies. Moreover, Lsa20 binding to laminin was also confirmed by surface plasmon resonance (SPR). Laminin competes with plasminogen for the binding to Lsa20 suggesting the same ligand-binding site. Lsa20-bound plasminogen could be converted to enzymatically active plasmin, capable to cleave plasmin substrate D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride. Lsa20 was recognized by antibodies in confirmed-leptospirosis serum samples suggesting that this protein is expressed during infection. Taken together, Lsa20 is a novel leptospiral adhesin that in concert with the host-derived plasmin may help the bacteria to adhere and to spread through the hosts.

### 1 INTRODUCTION

Leptospirosis is a worldwide zoonose infection of human and veterinary concern. The disease is caused by spirochaetes of the genus *Leptospira* with greater incidence in tropical and subtropical regions (16). The transmission of leptospirosis is associated with exposure of individuals near to wild or farm animals. Recently, the disease has been prevalent in cities with sanitation problems and a large population of rodent reservoirs that contaminate the environment through

their urine (10). Symptoms of the disease include fever, vomiting, headache, diarrhea, abdominal and generalized muscle pain. The severe form of leptospirosis, known as Weil's syndrome, seen in 5 to 15% of patients, is a multisystemic febrile illness, with hepatic, renal and pulmonary involvement and a mortality rate of 5 to 40% (16). Leptospirosis represents a great economic impact in the agricultural industry because the disease affects livestock inducing abortions, stillbirths, infertility, reduced milk production and death (10).

Whole-genome sequencing has greatly impacted the microbial topic with the development of new large-scale technologies, such as bioinformatics. The identification of many unknown, predicted to be surface exposed proteins, has opened possibilities for studies on protein function, leading to an understanding of the biology of the pathogen (1, 48). Genome annotation of *L. interrogans* serovar Copenhageni identified more than 200 predicted outer membrane proteins (34, 35). These proteins are exposed to hosts and then are potential targets for inducing immune response during infection. In addition, it is possible that some of these membrane proteins mediate the initial adhesion to host cells, as has been reported by several researches (5, 7, 13, 14, 22, 23, 26, 29, 37, 41, 50, 55). After adherence, pathogens have to surmount host tissue barriers in order to reach blood circulation and organs. Proteolytic activity as exerted by plasmin, a serine protease of broad substrate spectrum, may help bacteria to disseminate through the host. We have reported that leptospire bind plasminogen at their surface and that plasmin can be generated in the presence of activator (55). More recently, we have identified eight leptospiral proteins as plasminogen receptors (54).

In the present study, we focused on two hypothetical proteins of unknown function, encoded by the genes LIC11469 and LIC11030, predicted to be outer membrane proteins. The genes were cloned and the proteins expressed using *E. coli* as a host system. The recombinant proteins were purified and their ability to mediate attachment to various extracellular matrix (ECM) and biological components was evaluated. We report that one of them, Lsa20, is a novel surface exposed adhesin

that binds to laminin and to plasminogen, is probably expressed during infection and may thus participate in the pathogenesis of *Leptospira*.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 ECM and biological components.

Macromolecules, including the control protein fetuin, were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). Laminin-1 and collagen Type IV were derived from the basement membrane of Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma, cellular fibronectin was derived from human foreskin fibroblasts, plasma fibronectin, human complement serum and fibrinogen were isolated from human plasma and collagen Type I was isolated from rat tail. ECM gel is composed primarily of laminin, collagen type IV, heparan sulfate proteoglycan and entactin. Plasminogen native, purified from human plasma, was purchased from Merck. Human Factor H was from Calbiochem.

**2.2 *Leptospira* strains and serum samples.** The strains employed are pathogenic, high passage cultures: *L. interrogans* serovar Canicola strain Hound Utrecht IV, *L. interrogans* serovar Pomona strain Pomona, *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M 20, *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain RGA, *L. interrogans* serovar Hardjo strain Hardjoprajitno, *L. borgpetersenii* serovar Castellonis strain Castellon 3, *L. borgpetersenii* serovar Whitcombi strain Whitcomb, *L. borgpetersenii* serovar Cynoptery strain 3522C, *L. borgpetersenii* serovar Grippotyphosa strain Moskva V, *L. noguchi* serovar Panama strain CZ 214, *L. santarosai* serovar Shermani strain 1342 K and the non-pathogenic *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc, were cultured at 28 °C under aerobic conditions in liquid EMJH medium (Difco®) with 10% rabbit serum, enriched with L-asparagine (wt/vol: 0.015%), sodium pyruvate (wt/vol: 0.001%), calcium chloride (wt/vol: 0.001%), magnesium chloride (wt/vol: 0.001%), peptone (wt/vol: 0.03%) and meat extract (wt/vol: 0.02%) (51). *Leptospira* cultures are maintained in Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, SP, Brazil. Confirmed leptospirosis serum samples were from Instituto Adolfo Lutz collection, São Paulo, Brazil.

**2.3 Microscopic agglutination test (MAT).** The microscopic agglutination test was performed according to (16). In brief, an array of 22 serovars of *Leptospira* spp. as antigens were employed: Australis, Autumnalis, Bataviae, Canicola, Castellonis, Celledoni, Copenhageni, Cynoptery, Djasiman, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Sejroe, Shermani, Tarassovi and Wolffi. All the strains were maintained in EMJH liquid medium (Difco, USA) at 29 °C. A laboratory-confirmed case of leptospirosis was defined by the demonstration of a four-fold microagglutination titer rise between paired serum samples. The probable predominant serovar was considered to be the one with the highest dilution that could cause 50 % of

agglutination. MAT was considered negative when the titer was below 100.

### 2.4 Characterization of the coding sequences *in silico*.

The rationale for predicted coding sequences (CDSs) LIC11469 and LIC11030 selection was mostly based on cellular localization; the prediction was performed by PSORT program (33) <http://psort.nibb.ac.jp>. The SMART (47) <http://smart.embl-heidelberg.de/> and PFAM (17) <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/> web servers were used to search for predicted functional and structural domains. The presence of lipobox putative sequence was evaluated by use of the LipoP program (24) <http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>.

### 2.5 Cloning, expression and purification of recombinant proteins.

Amplification of the LIC11469 and LIC11030 CDSs were performed by the PCR from *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20 genomic DNA using the primer pairs: (F) 5'CTCGAGCCAATTTCTTTTCGATCCAAATC and (R) 5'AAGCTTCAATCCTCTACTGCAGCCC for LIC11469, and (F) 5'CTCGAGTGTACAAACGAAAAAGAAGGT and (R) 5'AAGCTTTTAGTTGCAAGGATTGGA for LIC11030. Both gene sequences were amplified without the signal peptide tag. Gel-purified PCR fragments (Illustra GFX PCR DNA and Gel band Purification kit, GE Healthcare) were cloned into the *E. coli* expression vector pAE (44) at XhoI and HindIII restriction sites. The construct was verified by DNA sequencing on an ABI Prism 3730\_L sequencer (Seq-Wright, Houston, TX) with appropriate T7 promoter-specific primers (5'TAATACGACTCACTATAGGG and 5'CAGCAGCCAACTCAGTTCCT). *E. coli* BL21-SI (9) and *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS host cells were transformed with the plasmids pAE-LIC11469 and pAE-LIC11030, respectively. Protein expression was achieved by inoculating 8 ml of a culture grown overnight in 200 ml of Luria-Bertani (LB) medium without NaCl containing 100 µg/ml ampicillin for *E. coli* BL21-SI cells, or LB medium containing 100 µg/ml ampicillin and 34 µg/ml chloramphenicol for *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS cells. The cultures were grown with continuous shaking at 30 °C until an optical density of 0.6 at 600 nm and then induced for 3 h under constant agitation at 30 °C in the presence of 300 mM NaCl or 1 mM isopropyl- $\mu$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Both proteins were expressed in insoluble form, as inclusion bodies. The cells were harvested by centrifugation, the bacterial pellet was resuspended in sonication buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 200 mg/ml lysozyme, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF, and 1 % Triton X-100) and lysed on ice with the aid of a ultrasonic cell disruptor (Sonifier 450, Branson, USA). The bacterial lysate was centrifuged at 3,000 x g for 15 min at 4 °C. The pellets were resuspended in buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 500 mM NaCl; 8 M urea and 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, in the case of rLIC11030, or 6 M guanidine; 20 mM Tris-HCl, pH8.0; 500 mM NaCl and 5 mM imidazol, in the case of Lsa20. The proteins were purified through Ni<sup>2+</sup>-charged beads

of chelating fast-flow chromatographic column (GE Healthcare). The rLIC11030 was refolded by 500 × dilution with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 500 mM NaCl before chromatographic purification. The Lsa20 was refolded on-column by gradually removing urea (6-0M). The efficiency of the purification was evaluated by 15 % SDS-PAGE. Fractions containing the recombinant proteins were extensively dialyzed against PBS containing 0.1 % glycine.

**2.6 Antiserum production against recombinant proteins.** The recombinant proteins were adsorbed in 10 % (vol/vol) of Alhydrogel (2 % Al(OH)<sub>3</sub>, Brenntag Biosector, Denmark), used as adjuvant. Ten micrograms of Lsa20 or rLIC11030 were subcutaneously administered in female BALB/c mice (4-6 weeks old). Three subsequent booster injections were given at two-week intervals with the same protein preparation. Negative control mice were injected with PBS. Two weeks after each immunization, the mice were bled from the retro-orbital plexus and the sera were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of antibody titers. Prior to experiments, anti-recombinant proteins sera were adsorbed to a suspension of *E. coli* to suppress the reactivity of anti-*E. coli* antibodies (18). Male Golden Syrian hamsters (6 - 8 weeks old) were immunized subcutaneously with 50 µg of recombinant protein adsorbed in 10 % Alhydrogel, used as adjuvant. Two subsequent booster injections were given at two-week intervals with the same preparation of recombinant protein (50 µg). Two weeks after each immunization, hamsters were bled by cardiac puncture and the sera were analyzed by ELISA for the determination of antibody titers. All animal studies were approved by the Ethics Committee of the Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil. All animal studies were approved by the Ethics Committee of the Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil.

**2.7 ELISA for detection of human antibodies.** Human IgG antibodies against Lsa20 or rLIC11030 were detected by ELISA as previously described (36). In brief, samples (negative and positive MAT sera from 40 confirmed-leptospirosis patients) were diluted 1:200 and evaluated for total IgG using goat HRP-conjugated anti-human IgG antibodies (1:5,000, Sigma). Cutoff values were set at three standard deviations above the mean OD<sub>492nm</sub> of sera from 10 health individuals, unexposed to leptospirosis, from the city of São Paulo, Brazil.

**2.8 Protein conservation among leptospiral strains.** Bacterial cultures of *Leptospira* spp. were harvested by centrifugation, washed three times with PBS containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and resuspended in PBS. The purified recombinant proteins, or the protein extracts from leptospirae, were loaded into 15 % SDS-PAGE, the proteins transferred to nitrocellulose membrane (Hybond ECL, GE Healthcare) in semidry equipment (GE Healthcare) and then analyzed by immunoblotting (see below).

**2.9 Immunoblotting analysis.** The membranes were blocked overnight at 4°C with 10 % nonfat dry in PBS containing 0.05 % Tween 20 (PBS-T). After three washings with PBS-T, the membranes were incubated with mouse anti-Lsa20 (1:100), mouse anti-rLIC11030 (1:100) or mouse monoclonal anti-polyHistidine (1:3,000, Sigma) for 2h at room temperature. After washing, the membranes were incubated with goat HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:5,000, Sigma) for 1 h at room temperature. The membrane was then washed and the reactivity was revealed with ECL reagents kit chemiluminescence substrate (GE Healthcare) and subsequent exposition to X-ray film (T Mat G/RA film, KODAK, Rochester, NY).

**2.10 Proteinase K accessibility assay.** The enzymatic digestion was performed as described by Pinne and Haake (41) with some modification. In brief, 5 mL of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20 culture grown at 28 °C were harvested by centrifugation 8,000 × g for 10 min at room temperature and gently washed with PBS containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Leptospirae were washed and resuspended in proteolysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) with 25 µg/mL of proteinase K (PK, Sigma). As a negative control, leptospirae were incubated with proteolysis buffer without PK. Both aliquots were incubated for 1-6 h at 37 °C before the addition of 2 mM PMSF to stop PK activity. The suspensions were subsequently pellet by centrifugation at 11,500 × g for 5 min, washed twice with PBS-5 mM MgCl<sub>2</sub> and resuspended in PBS for immunoblotting analysis using antibodies against Lsa20 and rLIC11030, as described above. Band intensities were evaluated using Gel Quantifier Image Analysis (GelQuant), version 2.7.0, in a MiniBIS Pro gel documentation system (DNR Imaging System, Ltda).

**2.11 Binding of recombinant proteins to ECM, Plasminogen, Complement and Factor H components.** Protein attachment to individual macromolecules of the extracellular matrix was analyzed according to a previously published protocol (7) with some modifications. Briefly, 96-well plates (Costar High Binding, Corning) were coated with 1 µg of laminin, collagen type I, collagen type IV, cellular fibronectin, plasma fibronectin, fibrinogen, ECM mix gel, human plasminogen, factor H, complement mix or bovine serum albumin (BSA, negative control) and fetuin (highly glycosylated attachment-negative control protein) in 100 µL of PBS for 3 h at 37 °C. The wells were washed three times with PBS-T and then blocked with 200 µL of 10 % (wt/vol) non-fat dry milk (overnight at 4 °C). One microgram of each recombinant protein was added per well in 100 µL of PBS, and protein was allowed to attach to the different substrates for 2 h at 37°C. After washing six times with PBS-T, bound Lsa20 or rLIC11030 were detected by adding mouse anti-recombinant proteins (1:1,000) in 100 µL of PBS. Incubation proceeded for 1 h at 37°C. After three washings with PBS-T, 100 µL of a 1:5,000 dilution of HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma) in PBS was added per well for 1 h at 37°C. The wells were



washed three times, and o-phenylenediamine (OPD) (1 mg/mL) in citrate phosphate buffer (pH 5.0) plus 1  $\mu$ L/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added (100  $\mu$ L per well). The reaction proceeded for 10 min and was interrupted by the addition of 50  $\mu$ L of 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The absorbance at 492 nm was determined in a microplate reader (TP-reader, Thermo). For statistical analyses, the binding of recombinant proteins to ECM macromolecules was compared to its binding to fetuin by Student's two-tailed t test.

**2.12 Dose-response curves.** First, 96-well plates were coated overnight in PBS at 4 °C with 100  $\mu$ L of 10  $\mu$ g/ml plasminogen or laminin. Plates were then blocked and increasing concentrations of the purified recombinant proteins (0 -10  $\mu$ M) were added (100  $\mu$ L/well in PBS). The assessment of bound proteins was performed by incubation for 1 h at 37 °C with the antiserum raised against each protein at the dilution of 1:1,000, followed by HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma) (1:5,000 in PBS). For the reverse assay, 100  $\mu$ L of 10  $\mu$ g/ml solution of each purified recombinant protein was coated in the ELISA plate, and after the block, laminin or plasminogen concentrations varying from 0 to 1.5  $\mu$ g in PBS were used. The assessment of bound proteins was performed by incubation the antiserum raised against laminin (1:1,000, Sigma) or plasminogen (1:4,000, Calbiochem), respectively. The reaction was detected with OPD as describe above. The ELISA data were used to calculate the dissociation constant ( $K_D$ ) according to the method described by Pathirana et al. (38) and Lin et al. (27), based on the equation:  $A = \frac{A_{max} [\text{protein}]}{K_D + [\text{protein}]}$ , where A is the absorbance at a given protein concentration,  $A_{max}$  is the maximum absorbance for the ELISA plate reader (equilibrium), [protein] is the protein concentration and  $K_D$  is the dissociation equilibrium constant for a given absorbance at a given protein concentration (ELISA data point).

**2.13 Plasmin enzymatic activity assay.** Plates (96-well) were coated overnight with 10  $\mu$ g/ml recombinant proteins or BSA in PBS at 4 °C. The plates were then washed once with PBS-T and blocked with PBS with 10 % (wt/vol) non-fat dry milk for 2 h at 37 °C. The blocking solution was discarded and 100  $\mu$ L/well of 10  $\mu$ g/ml human plasminogen was added, followed by incubation for 2 h at 37 °C. Wells were washed three times with PBS-T, and then 4 ng/well of human uPA (Sigma) were added. Subsequently, 100  $\mu$ L/well of the plasmin-specific substrate D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride (Sigma) were added at a final concentration of 0.4 mM in PBS. Plates were incubated overnight at 37 °C and substrate was measured by taking readings at 405 nm.

**2.14 Antibody inhibition assay.** 96-well plates were coated overnight at 4 °C with 1  $\mu$ g of Lsa20, rLIC11030, BSA, laminin or plasminogen in 100  $\mu$ L of PBS for 3 h at 37 °C. The wells were washed three times with PBS-T and then blocked with 200  $\mu$ L of 10 % (wt/vol) non-fat dry milk (overnight at 4 °C). One microgram of laminin, PLG or recombinant protein was added per well in 100  $\mu$ L of PBS, and

protein was allowed to attach to the different substrates for 2 h at 37°C. In one condition, the recombinant proteins were previously denatured by incubation for 10 min at 96°C; in other, the proteins were incubated for 1h at 37°C with anti-recombinant protein antibodies produced in hamster (1:500) prior to the next step. After washing six times with PBS-T, bound Lsa20, rLIC11030, laminin or PLG were detected by adding mouse anti-recombinant proteins (1:1,000), mouse monoclonal anti-polyHistidine (1:3,000, Sigma) or antibodies against laminin (1:1,000, Sigma) or plasminogen (1:4,000, Calbiochem) in 100  $\mu$ L of PBS. Incubation proceeded for 1 h at 37°C. After three washings with PBS-T, 100  $\mu$ L of a 1:5,000 dilution of HRP-conjugated goat anti-mouse (or anti-rabbit) IgG (Sigma) in PBS was added per well for 1 h at 37°C. The detection was performed by OPD as previously described.

**2.15 Surface Plasmon Resonance (SPR).** Protein-protein interactions were assessed by surface plasmon resonance with a BIAcoreT100 system (GE). Laminin was covalently immobilized on the BIAcore CM-5 sensorchip (GE) (carboxymethylated dextran matrix) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the CM-5 chip was activated with a 1:1 mixture of 0.4 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and 0.1 M N-hydroxysuccinimide for 7 min. Laminin (1 mg/ml) in 10 mM sodium citrate, pH 4.5, was injected over the activated CM-5 chip at 25°C. Remaining active groups on the matrix were blocked with 1 M ethanolamine/HCl, pH 8.5. Immobilization on CM-5 sensorchip resulted in average surface concentrations of 4.9 ng/mm<sup>2</sup>. Protein solutions of Lsa20 (0, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0  $\mu$ M) in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant P20, pH 7.4 were injected over immobilized laminin at a flow rate of 30  $\mu$ L/min for 1 min at 25°C. Individual experiments were performed a minimum of three times.

**2.16 Interference of laminin (or plasminogen) with plasminogen (or laminin) binding by Lsa20.** 96-well plates were coated overnight at 4 °C with 100  $\mu$ L of 10  $\mu$ g/ml Lsa20 in PBS, washed once and blocked with 10% (w/v) non-fat dry milk for 2 h at 37 °C. The plates were then incubated for 2 h at 37 °C with 1  $\mu$ g plasminogen together with increasing concentrations of laminin (0 to 1.0  $\mu$ g). After four washings, plasminogen binding was quantified by specific antibodies as described above. Similar experiments were performed to evaluate the interference of plasminogen with laminin binding to Lsa20. 96-well plates were coated overnight at 4 °C with 100  $\mu$ L of 10  $\mu$ g/ml Lsa20 in PBS, washed once and blocked with 10% (w/v) non-fat dry milk for 2 h at 37 °C. The plates were then incubated for 2 h at 37 °C with 1  $\mu$ g laminin together with increasing concentrations of plasminogen (0 to 1.0  $\mu$ g). After four washings, laminin binding was quantified by specific antibodies as described above.

**2.17 Inhibition of live leptospire to bind laminin or plasminogen by Lsa20.** ELISA plates were coated with laminin or plasminogen (1  $\mu$ g/well). The

plates were washed and blocked with 10% non-fat dry milk in PBS-T for 2 h at 37°C. The blocking solution was discarded, and the wells were incubated for 90 min at 37°C with increasing concentrations of Lsa20 (0 to 7.5 µg). After three washings, 50 µL/well of  $4 \times 10^7$  live low-passage *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20 were added for 90 min at 37°C. The unbound leptospires were washed and the quantification of bound leptospires was performed indirectly by anti-LipL32 antibodies produced in mice (1:4,000), given the fact that LipL32 is a major outer membrane leptospiral protein (20); the procedure was followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibodies, essentially as described in Barbosa et al. (7). The detection was performed by OPD as previously described.

### 2.18 Nucleotide sequence accession numbers.

GenBank accession numbers for protein sequences LIC11469 and LIC11030 are AAS70067.1 and AAS69637.1, respectively. The protein can also be accessed by the genome nomenclature for the gene locus, LIC number (*Leptospira interrogans* serovar Copenhageni).

## 3 RESULTS

**3.1 Bioinformatic analysis.** We have selected predicted coding sequences based on cellular localization since surface proteins are potential targets for mediating interactions with the host. Thus, both LIC11469 and LIC11030 CDS were predicted to be outer membrane proteins (> 79%) according to PSORT program (33). The LipoP server predicted both CDS to be lipoproteins with a cleavage site for signal peptidase II at amino acids 19–20 (LIC11469) and 17–18 (LIC11030) (24). The gene LIC11469 encodes a hypothetical protein with no recognized domain by BLAST (2) and PFAM analysis (49), while LIC11030 contains three PbH1 (Parallel beta-helix repeats) sequence tags, according to SMART program (47). BLAST analysis showed that similar sequences of both genes were identified in *L. interrogans* serovar Lai (45) but only LIC11469 sequence was found in *L. borgpetersenii* (12) with 82% identity. In the case of both sequenced strains of *L. biflexa* serovar Patoc (39), a sequence having 29% identity with the gene LIC11469 was identified.

**3.2 Cloning, expression and characterization of recombinant protein.** Oligonucleotides for PCR amplifications (see Materials and Methods) were designed based on genome sequences excluding the signal peptides. The amplified coding sequences were cloned into an *E. coli* pAE vector (44) and the proteins were expressed as full-length proteins with 6X His tag at the N-terminal of each recombinant protein. Both proteins were expressed in the bacterial pellet, in their insoluble form, as inclusion bodies (Fig. 1A, lane 5 and 1B, lane 5). Proteins were recovered from inclusion bodies after solubilization with 8 M urea or 6 M guanidine. The purification was performed by metal chelating chromatography under denaturing conditions, followed by refolding by gradual removal of urea.

The proteins were purified by metal-chelating chromatography and proteins were recovered with 0.5 and 1.0 M imidazol, for Lsa20 and rLIC11030, respectively. Protein purification was evaluated by SDS-PAGE, as shown in lane 7 of Fig. 1A and 1B. The recombinant protein bands were further confirmed by western blotting probed with anti-His tag antibodies (Fig. 1A and 1B, lane 8). In the case of Lsa20, another protein band, with approximately the double of the molecular mass, was also co-purified and detected with the anti-His tag (Fig. 1A, lanes 7 and 8), and is probably a protein dimer. The calculated 20 kDa and 37 kDa molecular masses of the recombinant proteins Lsa20 and rLIC11030 comprise the vector fusion plus the encoded amino acids.

### 3.3 Protein conservation among leptospiral reference strains.

Protein expression and conservation among *Leptospira* strains was assessed with total protein extracts from the same pathogenic strains of *Leptospira*, mentioned above, and the non-pathogenic strain *L. biflexa* serovar Patoc. Cell extracts were gel fractionated, proteins membrane-transferred and western blotting analysis was performed by probing the membranes with polyclonal serum from mice immunized with Lsa20 (Fig. 2A) and with rLIC11030 (Fig. 2B) recombinant proteins. The serological reactivity showed conservation of LIC11469 CDS in the main serovars of *L. interrogans* and at least in one serovar of *L. borgpetersenii* out of four tested (Fig. 2A). A protein band was detected in the non-pathogenic saprophytic *L. biflexa* strain, in agreement with BLAST analysis that showed partial match with the sequence present in the sequenced strain. Protein expression of LIC11030 CDS was observed in the same three serovars of *L. interrogans* where transcripts were identified (Fig. 2B).

### 3.4 Cellular localization of the recombinant proteins by protease assay.

We have performed localization experiments with proteinase K treatment of intact leptospires (37, 41). A proteinase K solution of 25 µg/ml concentration was used for both proteins and aliquots of the reaction mixture were taken for 6h. Samples were gel fractionated, proteins blotted into the membranes. Proteins were then probed with antiserum against each of them. The CDS LIC11469 and LIC11030 were both susceptible to protease treatment, as protein bands gradually disappear in function of time (Fig. 3A and 3B). The protoplasmic cylinder marker protein GroEL (21), used as negative control for surface proteolysis, was not, or only mildly digested under the same conditions tested (Fig. 3C), suggesting that both coding sequences assayed are surface exposed. Densitometric readings provide information regarding the amount of remaining proteins after addition of proteinase K in function of time. The percentage was calculated based on time zero (Fig. 3D), and shows that after 6h approximately 60% of GroEL remained while no LIC11469 and LIC11030 CDS were detected.

### 3.5 Adhesion of Lsa20 and rLIC11030 proteins to ECM components.

As Lsa20 and rLIC11030 proteins are probably surface-exposed, we evaluated whether they could mediate host colonization by adhering to extracellular matrix proteins. Thus, laminin, collagen Type I, collagen Type IV, cellular fibronectin, plasma fibronectin, ECM gel, and the control proteins BSA and fetuin were immobilized on 96-wells microdilution plates and recombinant proteins attachment were assessed by an ELISA-based assay, as previously described in Barbosa et al., (7). As shown in Fig. 4A, Lsa20 protein exhibited efficient adhesiveness to laminin ( $P < 0.05$ ), while rLIC11030 did not show significant binding to any of ECM tested, including the ECM gel. The adherence of Lsa20 to ECM gel was expected as laminin is one of the components (see M&M). No statistically significant adhesiveness was observed with Lsa20 protein when wells were coated with collagen Type I and IV, plasma or cellular fibronectin, BSA or with the highly glycosylated control protein fetuin. The interaction between Lsa20 with laminin was also assessed on a quantitative basis by varying protein concentration, as depicted in Fig. 4B. A dose-dependent and saturable binding was observed when increasing concentrations of the recombinant protein (0 – 10 $\mu$ M) were allowed to adhere to a fixed laminin concentration (1  $\mu$ g) (Fig. 4B). No significant attachment of rLIC11030 to laminin was detected within the same protein concentration range. Binding saturation level was reached with protein concentration of  $\sim 9$   $\mu$ M, ( $K_D$ , 1,988.00 + 563.49 nM). Binding of Lsa20 to laminin was also detected when anti-polyhistidine monoclonal antibodies were used to probe Lsa20 attached to laminin (Fig. 4C-1), instead of mice polyclonal antibodies against Lsa20 (Fig. 4C-3) or the inverse situation, protein-coated well bound to laminin and probed with anti-laminin antibodies (Fig. 4C-5). No binding to laminin was detected when Lsa20 was previously denatured (Fig. 4C-4) or blocked with anti-Lsa20 produced in hamsters (Fig. 4C-2). No binding was detected when the same set of conditions was applied with rLIC11030 and BSA. Interaction of Lsa 20 with laminin was also determined using the BIAcore™ T100 system, using protein concentration range from 0 to 10  $\mu$ M that were injected over immobilized laminin (Fig. 4D).

### 3.6 Recombinant leptospiral protein Lsa20 binds human plasminogen.

In our previous work we have shown that leptospires bind plasminogen on their surface (57) and we have also described several proteins that probably are plasminogen receptors (54). We thus decided to evaluate if the selected surface-exposed proteins, Lsa20 and rLIC11030 can also adhere to human plasminogen *in vitro*. In addition, we investigated whether the recombinant proteins can also bind factor H, fibrinogen components and human complement, as previously reported for other recombinant proteins (8, 28, 40, 53). Our data show that Lsa20 binds human plasminogen ( $P < 0.05$ ) while very low reactivity was detected with rLIC11030 and the control protein BSA (Fig. 5A). None of the proteins interacted significantly with factor H, human

complement or fibrinogen (Fig. 5A). The binding between Lsa20 and plasminogen is dose-dependent and saturable when increasing concentrations of the recombinant protein Lsa20 (0 to 10  $\mu$ M) were allowed to react with a fixed (1  $\mu$ g) plasminogen concentration ( $K_D$ , 509.13 + 77.47 nM) (Fig. 5B). No significant attachment of rLIC11030 to plasminogen was detected within the same protein concentration range. Binding of Lsa20 to plasminogen was also detected when anti-polyhistidine monoclonal antibodies were used to probe Lsa20 attached to plasminogen (Fig. 5C-1), instead of mice polyclonal antibodies against Lsa20 (Fig. 5C-3) or the inverse situation, protein-coated well bound to plasminogen and probed with anti-plasminogen antibodies (Fig. 5C-5). No binding to plasminogen was detected when Lsa20 was previously denatured (Fig. 5C-4) or blocked with anti-Lsa20 produced in hamsters (Fig. 5C-2). No binding was detected when the same set of conditions was applied with rLIC11030 and BSA.

### 3.7 Plasmin generation from plasminogen-bound Lsa20 .

Enzymatically active plasmin is generated by plasminogen bound to the surface of *L. interrogans* when its activator is present (57). To assess whether the plasminogen bound to Lsa20 generates proteolytic activity, as previously reported with other recombinant proteins (52, 54), a microplate was coated with Lsa20, blocked, and then incubated with plasminogen. Unbound plasminogen was washed away, the uPA (urokinase)-type plasminogen activator together with a plasmin-specific chromogenic substrate were added. The reaction was carried out overnight and the plasmin activity was evaluated by measuring the cleavage of the plasmin-specific substrate D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride at 405 nm. The plasminogen captured by Lsa20 protein could be converted into plasmin, as indirectly demonstrated by specific proteolytic activity of (Fig. 5D). The negative controls lacking plasminogen, uPA or the chromogenic substrate showed no enzymatic activity.

### 3.8 Laminin and plasminogen compete for the binding with Lsa20.

As both components exhibit adhesiveness to Lsa20, we have evaluated whether laminin or plasminogen competes for the same binding site to Lsa20 or interfere somehow in the interaction. We performed the binding assay in the presence of increasing concentrations of laminin (0 to 1.0  $\mu$ g) or plasminogen (0 to 1.0  $\mu$ g). The results show that both, laminin (Fig.6A) and plasminogen (Fig. 6B) interfere with the binding to Lsa20 in a dose-dependent fashion. The addition of laminin decreased the plasminogen binding to Lsa20 that reached significance with laminin at 0.75  $\mu$ g (\*,  $P < 0.05$ ) (Fig. 6A). Similar behavior was observed when increasing concentration of plasminogen was added to the laminin- Lsa20 reaction (Fig. 6B), suggesting that both molecules compete for the same protein binding site.

**3.9 Inhibition of *L. interrogans* attachment to laminin or to plasminogen by Lsa20.** It has been previously shown that the recombinant proteins

Lsa24/ (LfhA/LenA) (7), Lsa63 (56) and OmpL37 (40) exhibited an inhibitory effect on the binding of leptospires to ECM macromolecules. We thus carried out similar experiments to evaluate the effect of Lsa20 on leptospiral adherence to laminin or plasminogen by employing an ELISA-based assay in function of protein concentration (0-7.5 µg). The results show that the addition of increasing concentration of Lsa20 reduced the leptospiral binding to laminin and to plasminogen molecules in a dose-dependent manner (Fig. 7). Binding reduction in the number of leptospires adhering to plasminogen was significant with 2.5 µg of Lsa20 (\*,  $P < 0.05$ ) while to laminin significance was reached with 5.0 µg protein (\*,  $P < 0.05$ ). The experiment was performed in triplicate and Fig. 7 shows one representative data of two independent experiments.

**3.10 Reactivity of Lsa20 and rLIC11030 with serum samples from individuals with leptospirosis.** Serum samples from individuals with confirmed leptospirosis were used to test recognition of Lsa20 and rLIC11030. We have performed ELISA-based and employed 40 paired samples of early (MAT negative) and convalescent (MAT positive) phase of the disease. The recombinant protein Lsa20 was recognized by IgG antibodies in both phases of the disease, early and convalescent (Fig.8), while very low or no reactivity was detected with rLIC11030 (not shown). A total of 25 % responders presented IgG antibodies against Lsa20 in the early phase of the disease, while 50 % presented IgG antibodies in the convalescent phase (Fig. 8). These data suggest that Lsa20 protein is expressed during leptospiral infection.

#### 4 DISCUSSION

One feature of leptospiral infection is the rapid dissemination inside the host and colonization of renal tubules (16). The capacity of the leptospires to adhere to laminin, cellular fibronectin, plasma fibronectin, collagen I and IV has been shown (7), and thus far, several leptospiral adhesins ECM-binding proteins have been identified. These include 36-kDa fibronectin-binding protein (31), LfhA/Lsa24 (7, 53), LigA and LigB proteins (14, 25), Len-family proteins (50), Lsa21 (5), LipL32 (22, 23), Lsa27 (29), Lp95 (6), TlyC (13), LipL53 (37), Lsa63 (56) and OmpL37 (40). After adherence, the bacteria have to overcome the barriers imposed by epithelial tissues and extracellular matrices. The acquisition of host-derived plasmin by leptospiral receptor-bound plasminogen can degrade fibronectin that may help bacterial dissemination (57).

Two putative leptospiral outer membrane proteins of unknown function were selected for our studies, LIC11469 and LIC11030. We report that one of them is a novel outer membrane protein of *Leptospira*, named Lsa20, which binds strongly to laminin, a constituent of the basement membrane underlying both the epithelium and the endothelium, and to plasminogen generating enzymatically active plasmin. The LIC11469 and LIC11030 CDSs were cloned and expressed in *E. coli* as a 20- and 37-

kDa full-length recombinant protein, respectively, having a 6XHis tag at N-terminal. The purified proteins exhibited a single major band in SDS-PAGE and were recognized by anti-His tag antibodies and homolog sera from mice immunized with each recombinant protein. The protein band of proximately 40 kDa is probably Lsa20 protein-dimer because it was recognized by both antibodies employed. The coding sequence LIC11469 (Lsa20) was conserved in several serovars of *L. interrogans* and other pathogenic species tested, unlike LIC11030 coding sequence that appears to be restrict to *L. interrogans*. None of the coding sequences were detected in the non-pathogenic *L. biflexa* strain.

We have performed proteolysis studies on intact *Leptospira* cells to determine whether the predicted outer proteins in our studies are indeed located on bacterial surface. Proteinase has been previously employed with other spirochetes (11, 15, 43) and bacteria (32) to evaluate surface exposure of proteins. Pinne and Haake (41) and Oliveira et al., (37) have used proteinase K to assess outer membrane proteins in *Leptospira*. Proteolysis of the predicted CDSs LIC11469 and LIC11030 showed that both leptospiral proteins are sensible to proteinase K cleavage, contrasting with the cytoplasmic protein GroEL that showed only a slightly digestion, suggesting their surface localization. Interestingly, the native protein encoded by LIC11469 gene, like the Lsa20 recombinant protein, also appears to exhibit both mono and dimer forms.

Lsa20 is probably a surface exposed protein. It is therefore possible that it may have a role in the attachment to host tissues. Indeed, a dose-dependent specific and saturable binding of Lsa20 to immobilized laminin was observed ( $K_D$ , 1,988.00 ± 563.49 nM), fulfilling the properties of receptor-ligand interaction. No binding was detected when Lsa20 was subjected to denaturing condition or previously blocked with hamster anti-Lsa20 serum. Moreover, binding of Lsa20 to laminin was direct detected by SPR analysis. However, the affinity of Lsa20 to laminin is lower when compared to the  $K_D$  (410±81 nM) obtained with OmpL 37 and the same ECM component (40). Of all the ECM components tested (see Fig. 4A) attachment to laminin suggests that this protein is the major ECM target for Lsa20, a feature shared with other leptospiral laminin-binding proteins (7, 29, 50).

Plasminogen, a key component of the host fibrinolytic system, is the zymogen form of plasmin, a serine protease that has the ability to degrade a broad spectrum of substrates, including fibrin clots, connective tissue and components of extracellular matrices (3, 4, 42). We have reported that *Leptospira* spp. bind plasminogen at their surface generating plasmin when urokinase activator is available (57). We have also identified proteins that act as leptospiral plasminogen-receptors (54). Lsa20 also exhibits plasminogen-binding activity. No attachment of Lsa20 to plasminogen was detected when the protein was previously denatured or blocked by anti-Lsa20 produced in hamsters. The

binding is dose-dependent on protein concentration and reached saturation around 9  $\mu$ M of Lsa20 ( $K_D$ , 509.13  $\pm$  77.47 nM). This binding affinity is lower when compared to other recombinant proteins in our laboratory (54). As shown with other protein-plasminogen-receptors (52, 54), plasmin is actively generated in the presence of urokinase activator. Similar to LenA (LfhA/Lsa24), that binds laminin and plasminogen (7, 52), there is a competition for the binding of both ligands to Lsa20. However, contrasting with LenA (53), no binding activity of Lsa20 was detected with factor H.

The presence of Lsa20 inhibited the binding of intact *L. interrogans* to immobilized laminin or plasminogen. The inhibitory effect exerted by the recombinant protein was moderate, although statistically significant with both ligands, and can be explained by the existence of additional *L. interrogans* binding proteins contributing to the leptospiral attachment to laminin and to plasminogen. Similar data were obtained with Lsa24, Lsa63, LigA/LigB, OmpL37 leptospiral proteins (7, 14, 40, 56).

In conclusion, we have identified a novel leptospiral protein Lsa20 as a laminin-binding and as a receptor for plasminogen. We have characterized both protein-ligand interactions and show that Lsa20-bound plasminogen generates enzymatically active plasmin in the presence of urokinase activator. Lsa20 is recognized by antibodies in serum samples of individuals diagnosed with leptospirosis, suggesting that the protein is expressed during infection. This protein was previously genome annotated as a putative outer membrane protein of *L. interrogans* with unknown function (35). We show now that the protein encoded by LIC11469 is indeed a surface exposed protein with dual adherence and proteolytic-binding activities that may have role in leptospiral pathogenesis.

**ACKNOWLEDGMENT.** We are deeply indebted to Alexander Seixas de Souza (Departamento de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil) for use of Confocal facilities and helpful discussion. This work was supported by FAPESP, CNPq and Fundação Butantan, Brazil; RSM and MVA have fellowships from FAPESP.

## REFERENCES

- Adu-Bobie, J., B. Capecchi, D. Serruto, R. Rappuoli, and M. Pizza. 2003. Two years into reverse vaccinology. *Vaccine* **21**:605-610.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**:403-410.
- Angles-Cano, E. 1994. Overview on fibrinolysis: plasminogen activation pathways on fibrin and cell surfaces. *Chemistry and physics of lipids* **67-68**:353-362.
- Angles-Cano, E., A. de la Pena Diaz, and S. Loyau. 2001. Inhibition of fibrinolysis by lipoprotein(a). *Annals of the New York Academy of Sciences* **936**:261-275.
- Atzingen, M. V., A. S. Barbosa, T. De Brito, S. A. Vasconcellos, Z. M. de Morais, D. M. Lima, P. A. Abreu, and A. L. Nascimento. 2008. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC microbiology* **8**:70.
- Atzingen, M. V., R. M. Gomez, M. Schattner, G. Pretre, A. P. Goncalves, Z. M. de Morais, S. A. Vasconcellos, and A. L. Nascimento. 2009. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. *The Journal of infection*.
- Barbosa, A. S., P. A. Abreu, F. O. Neves, M. V. Atzingen, M. M. Watanabe, M. L. Vieira, Z. M. Morais, S. A. Vasconcellos, and A. L. Nascimento. 2006. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infection and immunity* **74**:6356-6364.
- Barbosa, A. S., D. Monaris, L. B. Silva, Z. M. Morais, S. A. Vasconcellos, A. M. Cianciarullo, L. Isaac, and P. A. Abreu. 2010. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. *Infection and immunity* **78**:3207-3216.
- Bhandari, P., and J. Gowrishankar. 1997. An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *J Bacteriol* **179**:4403-4406.
- Bharti, A. R., J. E. Nally, J. N. Ricaldi, M. A. Matthias, M. M. Diaz, M. A. Lovett, P. N. Levett, R. H. Gilman, M. R. Willig, E. Gotuzzo, and J. M. Vinetz. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet infectious diseases* **3**:757-771.
- Bryksin, A. V., A. Tomova, H. P. Godfrey, and F. C. Cabello. 2010. BmpA is a surface-exposed outer-membrane protein of *Borrelia burgdorferi*. *FEMS microbiology letters* **309**:77-83.
- Bulach, D. M., R. L. Zuerner, P. Wilson, T. Seemann, A. McGrath, P. A. Cullen, J. Davis, M. Johnson, E. Kuczek, D. P. Alt, B. Peterson-Burch, R. L. Coppel, J. I. Rood, J. K. Davies, and B. Adler. 2006. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:14560-14565.
- Carvalho, E., A. S. Barbosa, R. M. Gomez, A. M. Cianciarullo, P. Hauk, P. A. Abreu, L. C. Fiorini, M. L. Oliveira, E. C. Romero, A. P. Goncalves, Z. M. Morais, S. A. Vasconcellos, and P. L. Ho. 2009. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. *FEBS letters*.
- Choy, H. A., M. M. Kelley, T. L. Chen, A. K. Moller, J. Matsunaga, and D. A. Haake. 2007. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infection and immunity* **75**:2441-2450.
- Cox, D. L., A. Luthra, S. Dunham-Ems, D. C. Desrosiers, J. C. Salazar, M. J. Caimano, and J. D. Radolf. 2010. Surface immunolabeling and consensus computational framework to identify candidate rare outer membrane proteins of *Treponema pallidum*. *Infection and immunity* **78**:5178-5194.
- Faine, S., B. Adler, C. Bolin, and P. Perolat. 1999. *Leptospira and Leptospirosis*, p. 259. Second ed. MediSci, Melbourne, Australia.
- Finn, R. D., J. Mistry, B. Schuster-Bockler, S. Griffiths-Jones, V. Hollich, T. Lassmann, S. Moxon, M. Marshall, A. Khanna, R. Durbin, S. R. Eddy, E. L. Sonnhammer, and A. Bateman. 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic acids research* **34**:D247-251.
- Gruber, A., and B. Zingales. 1995. Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *BioTechniques* **19**:28, 30.
- Haake, D. A. 2000. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology (Reading, England)* **146** (Pt 7):1491-1504.
- Haake, D. A., G. Chao, R. L. Zuerner, J. K. Barnett, D. Barnett, M. Mazel, J. Matsunaga, P. N. Levett, and C. A. Bolin. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infection and immunity* **68**:2276-2285.
- Haake, D. A., and J. Matsunaga. 2002. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infection and immunity* **70**:4936-4945.
- Hauk, P., F. Macedo, E. C. Romero, S. A. Vasconcellos, Z. M. de Morais, A. S. Barbosa, and P. L. Ho. 2008. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and

- plasma fibronectin. *Infection and immunity* **76**:2642-2650.
23. **Hoke, D. E., S. Egan, P. A. Cullen, and B. Adler.** 2008. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infection and immunity* **76**:2063-2069.
  24. **Juncker, A. S., H. Willenbrock, G. Von Heijne, S. Brunak, H. Nielsen, and A. Krogh.** 2003. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci* **12**:1652-1662.
  25. **Lin, Y. P., and Y. F. Chang.** 2007. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. *Biochemical and biophysical research communications* **362**:443-448.
  26. **Lin, Y. P., A. Greenwood, L. K. Nicholson, Y. Sharma, S. P. McDonough, and Y. F. Chang.** 2009. Fibronectin binds to and induces conformational change in a disordered region of leptospiral immunoglobulin-like protein B. *The Journal of biological chemistry* **284**:23547-23557.
  27. **Lin, Y. P., D. W. Lee, S. P. McDonough, L. K. Nicholson, Y. Sharma, and Y. F. Chang.** 2009. Repeated domains of leptospira immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. *The Journal of biological chemistry* **284**:19380-19391.
  28. **Lin, Y. P., S. P. McDonough, Y. Sharma, and Y. F. Chang.** 2010. *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen alphaC domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. *Molecular microbiology* **79**:1063-1076.
  29. **Longhi, M. T., T. R. Oliveira, E. C. Romero, A. P. Goncales, Z. M. de Morais, S. A. Vasconcellos, and A. L. Nascimento.** 2009. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. *Journal of medical microbiology* **58**:1275-1282.
  30. **Malmstrom, J., M. Beck, A. Schmidt, V. Lange, E. W. Deutsch, and R. Aebbersold.** 2009. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature* **460**:762-765.
  31. **Merien, F., J. Truccolo, G. Baranton, and P. Perolat.** 2000. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. *FEMS microbiology letters* **185**:17-22.
  32. **Morrissey, J. A., A. Cockayne, J. Hammacott, K. Bishop, A. Denman-Johnson, P. J. Hill, and P. Williams.** 2002. Conservation, surface exposure, and in vivo expression of the Frp family of iron-regulated cell wall proteins in *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity* **70**:2399-2407.
  33. **Nakai, K., and M. Kanehisa.** 1991. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* **11**:95-110.
  34. **Nascimento, A. L., A. I. Ko, E. A. Martins, C. B. Monteiro-Vitorello, P. L. Ho, D. A. Haake, S. Verjovski-Almeida, R. A. Hartskeerl, M. V. Marques, M. C. Oliveira, C. F. Menck, L. C. Leite, H. Carrer, L. L. Coutinho, W. M. Degraive, O. A. Dellagostin, H. El-Dorri, E. S. Ferro, M. I. Ferro, L. R. Furlan, M. Gamberini, E. A. Gigliotti, A. Goes-Neto, G. H. Goldman, M. H. Goldman, R. Harakava, S. M. Jeronimo, I. L. Junqueira-de-Azevedo, E. T. Kimura, E. E. Kuramae, E. G. Lemos, M. V. Lemos, C. L. Marino, L. R. Nunes, R. C. de Oliveira, G. G. Pereira, M. S. Reis, A. Schriefer, W. J. Siqueira, P. Sommer, S. M. Tsai, A. J. Simpson, J. A. Ferro, L. E. Camargo, J. P. Kitajima, J. C. Setubal, and M. A. Van Sluys.** 2004. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *Journal of bacteriology* **186**:2164-2172.
  35. **Nascimento, A. L., S. Verjovski-Almeida, M. A. Van Sluys, C. B. Monteiro-Vitorello, L. E. Camargo, L. A. Digiampietri, R. A. Harstkeerl, P. L. Ho, M. V. Marques, M. C. Oliveira, J. C. Setubal, D. A. Haake, and E. A. Martins.** 2004. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al]* **37**:459-477.
  36. **Oliveira, T. R., M. T. Longhi, Z. M. de Morais, E. C. Romero, R. M. Blanco, K. Kirchgatter, S. A. Vasconcellos, and A. L. Nascimento.** 2008. Evaluation of leptospiral recombinant antigens MPL17 and MPL21 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin Vaccine Immunol* **15**:1715-1722.
  37. **Oliveira, T. R., M. T. Longhi, A. P. Goncales, Z. M. de Morais, S. A. Vasconcellos, and A. L. Nascimento.** 2010. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **12**:207-217.
  38. **Pathirana, R. D., N. M. O'Brien-Simpson, P. D. Veith, P. F. Riley, and E. C. Reynolds.** 2006. Characterization of proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology (Reading, England)* **152**:2381-2394.
  39. **Picardeau, M., D. M. Bulach, C. Bouchier, R. L. Zuerner, N. Zidane, P. J. Wilson, S. Creno, E. S. Kuczek, S. Bommezzadri, J. C. Davis, A. McGrath, M. J. Johnson, C. Boursaux-Eude, T. Seemann, Z. Rouy, R. L. Coppel, J. I. Rood, A. Lajus, J. K. Davies, C. Medigue, and B. Adler.** 2008. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* **3**:e1607.
  40. **Pinne, M., H. A. Choy, and D. A. Haake.** 2010. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. *PLoS neglected tropical diseases* **4**:e815.
  41. **Pinne, M., and D. A. Haake.** 2009. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. *PLoS ONE* **4**:e6071.
  42. **Ponting, C. P., J. M. Marshall, and S. A. Cederholm-Williams.** 1992. Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul Fibrinolysis* **3**:605-614.
  43. **Probert, W. S., K. M. Allsup, and R. B. LeFebvre.** 1995. Identification and characterization of a surface-exposed, 66-kilodalton protein from *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity* **63**:1933-1939.
  44. **Ramos, C. R., P. A. Abreu, A. L. Nascimento, and P. L. Ho.** 2004. 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 = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al]* **37**:1103-1109.
  45. **Ren, S. X., G. Fu, X. G. Jiang, R. Zeng, Y. G. Miao, H. Xu, Y. X. Zhang, H. Xiong, G. Lu, L. F. Lu, H. Q. Jiang, J. Jia, Y. F. Tu, J. X. Jiang, W. Y. Gu, Y. Q. Zhang, Z. Cai, H. H. Sheng, H. F. Yin, Y. Zhang, G. F. Zhu, M. Wan, H. L. Huang, Z. Qian, S. Y. Wang, W. Ma, Z. J. Yao, Y. Shen, B. Q. Qiang, Q. C. Xia, X. K. Guo, A. Danchin, I. Saint Girons, R. L. Somerville, Y. M. Wen, M. H. Shi, Z. Chen, J. G. Xu, and G. P. Zhao.** 2003. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* **422**:888-893.
  46. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd. ed., New York.
  47. **Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork, and C. P. Ponting.** 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:5857-5864.
  48. **Sette, A., and R. Rappuoli.** 2010. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity* **33**:530-541.
  49. **Sonnhammer, E. L., S. R. Eddy, and R. Durbin.** 1997. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* **28**:405-420.
  50. **Stevenson, B., H. A. Choy, M. Pinne, M. L. Rotondi, M. C. Miller, E. Demoll, P. Kraicz, A. E. Cooley, T. P. Creamer, M. A. Suchard, C. A. Brissette, A. Verma, and D. A. Haake.** 2007. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS ONE* **2**:e1188.
  51. **Turner, L. H.** 1970. Leptospirosis. 3. Maintenance, isolation and demonstration of leptospires. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **64**:623-646.
  52. **Verma, A., C. A. Brissette, A. B. Bowman, S. T. Shah, P. F. Zipfel, and B. Stevenson.** 2010. Leptospiral endostatin-like protein A (LenA) is a

- bacterial cell-surface receptor for human plasminogen. Infection and immunity.
53. Verma, A., J. Hellwage, S. Artiushin, P. F. Zipfel, P. Kraiczky, J. F. Timoney, and B. Stevenson. 2006. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. Infection and immunity **74**:2659-2666.
  54. Vieira, M. L., M. V. Atzingen, T. R. Oliveira, R. Oliveira, D. M. Andrade, S. A. Vasconcellos, and A. L. Nascimento. 2010. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. PLoS ONE **5**:e11259.
  55. Vieira, M. L., M. V. Atzingen, T. R. Oliveira, R. Oliveira, D. M. Andrade, S. A. Vasconcellos, and A. L. T. O. Nascimento. 2010. Characterization of novel plasminogen-binding receptors of *Leptospira interrogans*. submitted.
  56. Vieira, M. L., Z. M. de Moraes, A. P. Goncalves, E. C. Romero, S. A. Vasconcellos, and A. L. Nascimento. 2010. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. The Journal of infection **60**:52-64.
  57. Vieira, M. L., S. A. Vasconcellos, A. P. Goncalves, Z. M. de Moraes, and A. L. Nascimento. 2009. Plasminogen acquisition and activation at the surface of leptospira species lead to fibronectin degradation. Infection and immunity **77**:4092-4101.

## LEGEND TO FIGURES

**Figure 1. Recombinant protein analysis by SDS-PAGE and western blotting.** (A) Lsa20 and (B) rLIC11030 protein expression from NaCl-induced *E. coli* BL21-SI and IPTG-induced *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS cultures, respectively. **1 and 6**: molecular mass protein marker; **2**: non-induced total bacterial extract; **3**: total bacterial cell lysates after induction, **4 and 5**: soluble and insoluble (pellet) fractions of the induced culture, respectively; **7**: purified recombinant proteins in Coomassie blue stained gels; **8**: western blotting analysis of the recombinant proteins probed with anti-His tag antibodies.

**Figure 2. Conservation of LIC11469 and LIC11030 coding sequences among leptospira strains.** Whole cell lysates, Lsa20 and rLIC11030 were separated by SDS-PAGE, transferred into membranes and probed with antiserum against each recombinant protein followed by anti-mouse IgG conjugated to peroxidase. Reactivity was detected by ECL kit and X-ray films exposition. (A) western blotting of gel transferred to membrane probed with anti-Lsa20 and (B) with anti-rLIC11030. On the right are lanes (+) containing the respective recombinant protein as markers.

**Figure 3. Protease accessibility assay of LIC11469 and LIC11030 encoded proteins of *L. interrogans*.** Viable leptospirae were incubated with the indicated concentrations of proteinase K. Approximately 30 µg of total leptospiral extract were loaded per lane and separated by SDS-PAGE. After transfer, the immobilized extracts were subjected to immunoblot analysis using Lsa20 (A) and rLIC11030 (B) specific antibodies. In (C) antibodies specific for the protoplasmic cylinder protein GroEL was employed. Serum dilution was 1:100. The GroEL protein (same amount of cell extract) was used as an indicator of outer membrane integrity and as an internal control for proteinase K resistance. (D) Optical densities of the protein bands were taken and relative percentage was based on the corresponding protein amount in time zero (no proteinase K addition).

**Figure 4. Binding characteristics of Lsa20 and rLIC11030 to ECM components.** (A) Wells were coated with 1 µg of laminin, collagen type I, collagen type IV, cellular fibronectin, plasma fibronectin, ECM gel and the control proteins BSA and fetuin. 1 µg of the recombinant proteins was added per well and the binding was measured by an ELISA-based assay. Data represent the

mean ± the standard deviation from three independent experiments. For statistical analyses, the attachment of recombinant proteins to the ECM components was compared to its binding to BSA as well as fetuin by the two-tailed *t* test ( $*P < 0.005$ ). (B) Lsa20 dose-dependent binding experiments: each point was performed in triplicate and expressed as the mean absorbance value at 492 nm ± standard error for each point. Protein rLIC11030 was included as negative control. The dissociation constant ( $K_D$ ) is depicted in B and was calculated based on ELISA data for the Lsa20 recombinant protein that reached equilibrium at concentration of ~9µM. (C) Wells were coated with 1 µg of laminin, Lsa20, rLIC11030 or BSA (control). 1 µg of the proteins was added per well and the binding was measured by an ELISA-based assay. **1-** coating with laminin, followed by recombinant protein or BSA and incubation with anti-polyhistidine monoclonal antibodies. **2-** coating with laminin, followed by incubation with recombinant protein previously blocked by incubation with specific antibodies produced in hamster, and then incubation with anti-polyhistidine monoclonal antibodies. **3-** coating with laminin, followed by recombinant protein or BSA, and incubation with specific mouse anti-recombinant protein. **4-** coating with laminin, followed by incubation with denaturated recombinant protein and incubation with specific mouse anti-recombinant protein. **5-** coating with laminin and anti-laminin antibodies. Data represent the mean ± the standard deviation from two independent experiments. For statistical analyses, the attachment of recombinant proteins to laminin was compared to its binding to BSA by the two-tailed *t* test ( $*P < 0.02$ ). (D) Analysis of the interaction of Lsa20 with laminin using the BIAcore™ T100 system. Protein solutions of Lsa20 (0, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10 µM) in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant P20, pH 7.4 were injected over immobilized laminin at a flow rate of 30 µL/min for 1 min at 25°C.

**Figure 5. Recombinant protein Lsa20 binds human plasminogen and generates enzymatically active plasmin.** (A) Components were coated into ELISA plates (10µg/ml) and allowed to interact with 1 µg per well of the recombinant proteins, Lsa20 and rLIC11030. The binding was detected by specific serum anti-recombinant proteins. Bars represent the mean of absorbance at 492nm ± the standard deviation of three replicates for each protein and are representative of three independent experiments. For statistical analyses, the binding of Lsa20 to human plasminogen was compared to its binding to BSA by two-tailed *t* test ( $**P < 0.0005$ ). (B) Ten µg/ml of plasminogen was immobilized into 96-wells ELISA plates and 0 to 10 µM of each recombinant protein was added for interaction. Protein rLIC11030 was included as negative control. The binding was detected using antiserum raised in mice against the recombinant proteins in appropriate dilutions (1:1,000 for Lsa20) followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG. Data represent the mean absorbance values ± the standard deviation of three replicates for each experimental group. The dissociation constant ( $K_D$ ) is depicted in B and was calculated based on ELISA data for Lsa20 recombinant protein when reached the equilibrium concentration. (C) Wells were coated with 1 µg of PLG, Lsa20, rLIC11030 or BSA (control). 1 µg of the proteins was added per well and the binding was measured by an ELISA-based assay. **1-** coating with PLG, followed by recombinant protein or BSA and incubation with anti-polyhistidine monoclonal antibodies. **2-** coating with PLG, followed by incubation with recombinant protein previously blocked by incubation with specific antibodies produced in hamster, and then incubation with anti-polyhistidine monoclonal antibodies. **3-** coating with PLG, followed by recombinant protein or BSA, and incubation with specific mouse anti-recombinant protein. **4-** coating with PLG, followed by incubation with denaturated recombinant protein and incubation with

specific mouse anti-recombinant protein. **5-** coating with recombinant protein or BSA, followed by incubation with PLG and anti-PLG antibody. Data represent the mean  $\pm$  the standard deviation from two independent experiments. For statistical analyses, the attachment of recombinant proteins to laminin was compared to its binding to BSA by the two-tailed *t* test ( $*P < 0.02$ ). **(D)** Plasmin generation by plasminogen bound to recombinant protein Lsa20 was assayed by modified ELISA as immobilized proteins received the following treatment: PLG + uPA + specific plasmin substrate (PLG + uPA + S), or controls lacking one of the three components (PLG + uPA; PLG + S; uPA + S). BSA was employed as negative control. Bars represent mean absorbance at 405 nm, as a measure of relative substrate degradation  $\pm$  the standard deviation of four replicates for each experimental group and are representative of two independent experiments. Statistically significant binding in comparison to the negative control (BSA) is depicted:  $*P < 0.003$ .

**Figure 6. Laminin and plasminogen compete for the binding to Lsa20.** **(A)** The effect of laminin on the binding of plasminogen (10  $\mu\text{g/ml}$ ) to immobilized Lsa20 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) was performed with the addition of increasing concentrations of laminin (0 to 1.00  $\mu\text{M}$ ). In **(B)**: The effect of plasminogen on the binding of laminin (10  $\mu\text{g/ml}$ ) to immobilized Lsa20 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) was performed with the addition of increasing plasminogen concentration (0 to 1.00  $\mu\text{M}$ ). The detection of Lsa20 bound-plasminogen **(A)** or Lsa20 bound laminin **(B)** was assayed by specific antibodies. Bars represent the mean absorbance values  $\pm$  the standard deviation of four replicates for each condition and are representative of two independent experiments. Results of statistically significant interference with binding in comparison with the positive control (no addition of laminin or plasminogen) are shown:  $P < 0.05$  (\*).

**Figure 7. Inhibition of *L. interrogans* attachment to laminin or to plasminogen by Lsa20.** Laminin or plasminogen (1  $\mu\text{g/well}$ ) were adsorbed to microtiter plates followed by incubation with increasing concentrations of Lsa20 (0 to 7.50  $\mu\text{g}$ ) for 90 min at 37°C. Live leptospire (100  $\mu\text{L/well}$  of  $4 \times 10^7$  of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20) were added for 90 min at 37°C. The unbound leptospire were washed and the quantification of bound leptospire was performed indirectly by anti-LipL32 antibodies produced in mice (1: 4,000 dilution), followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibodies. Each point represents the mean absorbance value at 492 nm  $\pm$  the standard deviation of three replicates. Data are representative of 2 independent experiments. (\*)  $P < 0.009$ ; (\*)  $P < 0.005$ .

**Figure 8. Recognition of recombinant protein Lsa20 by IgG antibodies of individuals diagnosed with leptospirosis.** Positive sera (responders) were determined by ELISA with the recombinant protein and

serum samples from patients in both phases of the disease. The reactivity was evaluated as IgG antibodies. Serum was considered MAT positive or MAT negative if agglutination was detected when the sera were tested for their reactivity's with isolates of the 22 serovars (see Materials and Methods). The cutoff values are defined as the mean plus 3 standard deviations obtained for sera from five healthy individuals.



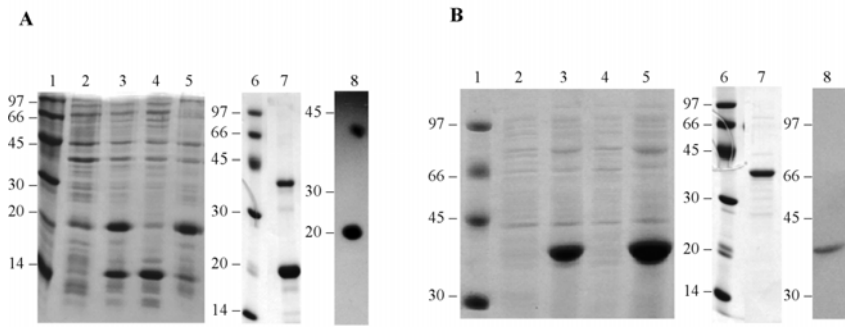


Figure 1

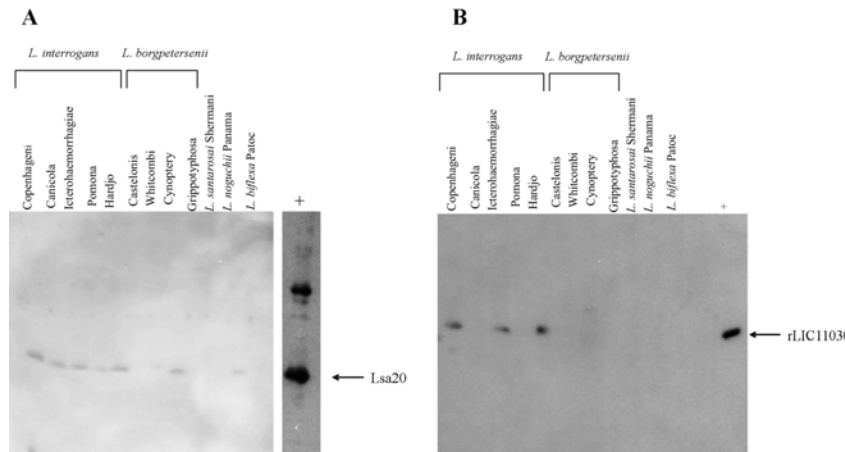


Figure 2

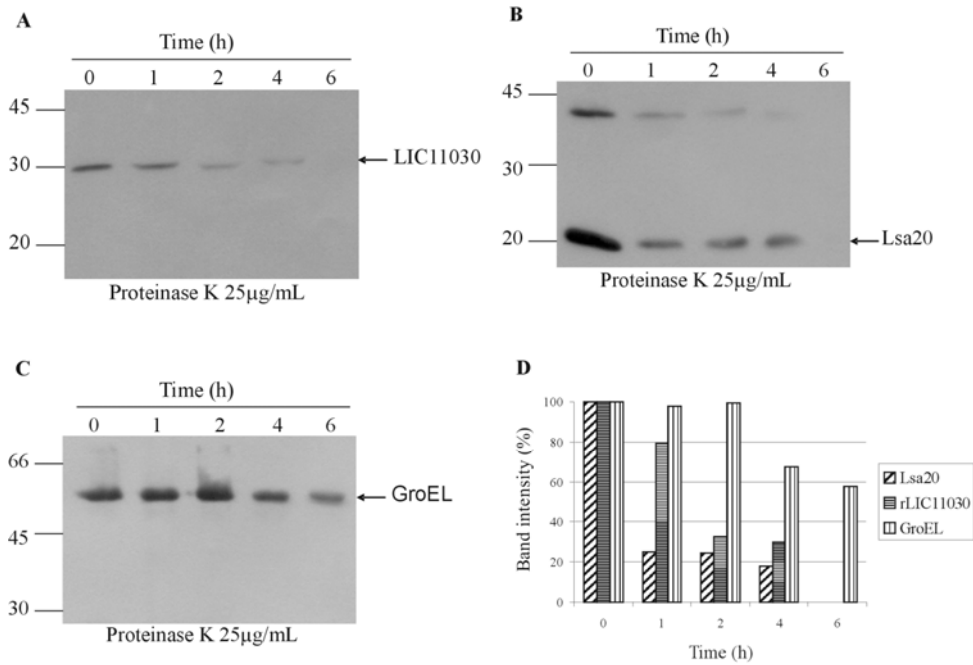


Figure 3

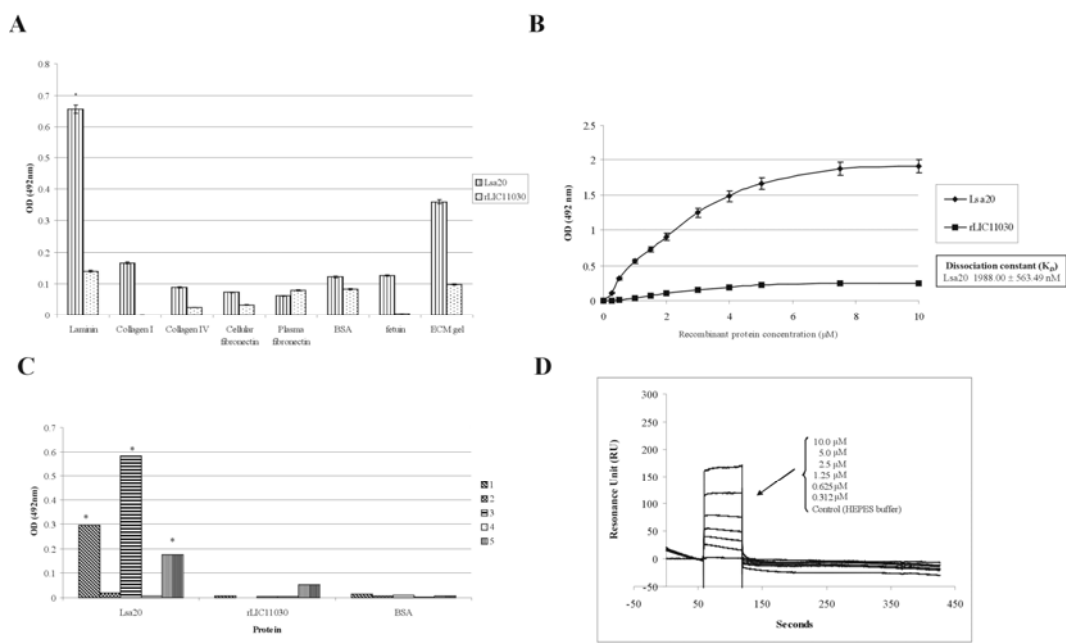


Figure 4

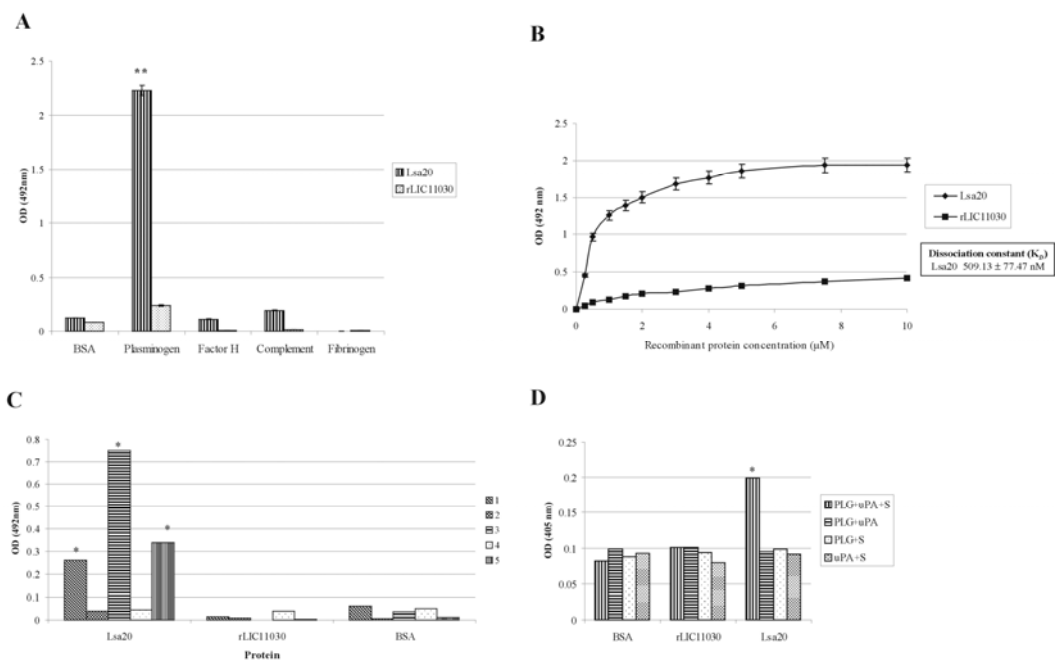


Figure 5

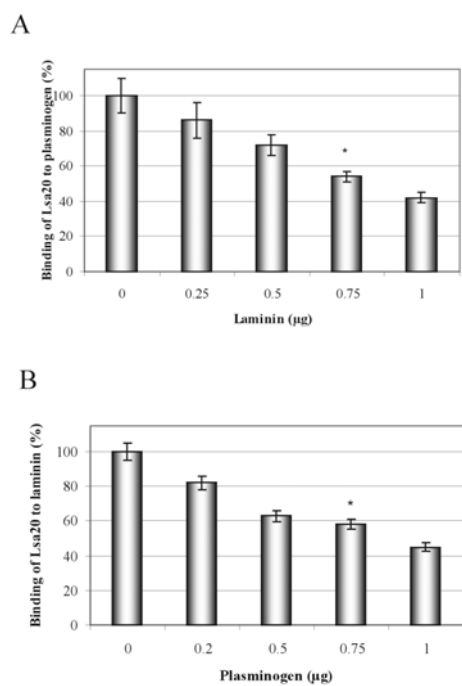


Figure 6

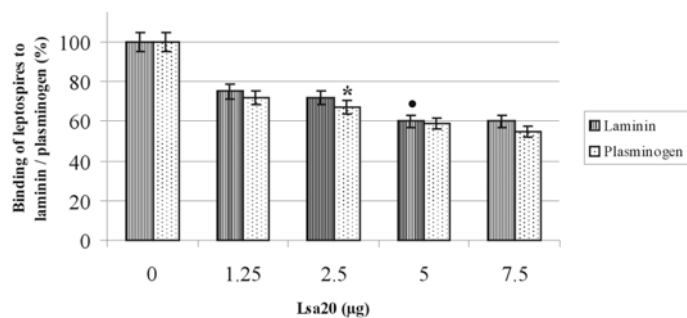


Figure 7

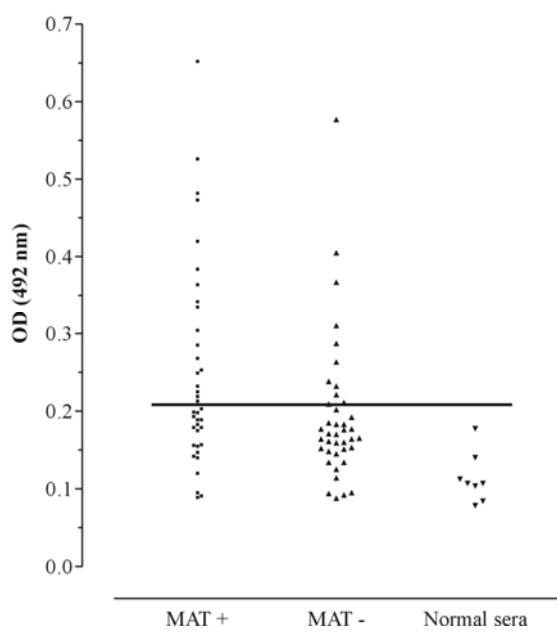


Figure 8