

LUIS GUILHERME VIRGÍLIO FERNANDES

**Caracterização e avaliação imunológica de três
proteínas de superfície de *Leptospira*
interrogans obtidas 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
2012

LUIS GUILHERME VIRGÍLIO FERNANDES

**Caracterização e avaliação imunológica de três proteínas
de superfície de *Leptospira interrogans* obtidas 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

Versão original

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Fernandes, Luis Guilherme Virgílio.

Caracterização e avaliação imunológica de três proteínas de superfície de *Leptospira interrogans* obtidas em *Escherichia coli* / Luis Guilherme Virgílio Fernandes. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Ana Lúcia 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.

Versão do título para o inglês: Characterization and immunological evaluation of three surface proteins of *Leptospira interrogans* obtained in *Escherichia coli*.

1. *Leptospira* 2. Leptospirose 3. Proteínas recombinantes
I. Nascimento, Profa. Dra. Ana Lúcia 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/SBIB0195/2012

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

Candidato(a): Luis Guilherme Virgílio Fernandes.

Título da Dissertação: Caracterização e avaliação imunológica de três proteínas de superfície de *Leptospira interrogans* obtidas em *Escherichia coli*.

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

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. 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 e avaliação imunológica de duas proteínas de membranas de *Leptospira interrogans* obtidas no hospedeiro *Escherichia coli*" protocolo nº 767/10, sob a responsabilidade de Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento e Luis Guilherme Virgilio Fernandes, 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 13/09/2010.

We certify that the research entitled "Characterization and immunological evaluation of two membrane proteins of *Leptospira interrogans* obtained in the host *Escherichia coli*", protocol nº 767/10, under the responsibility of Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento and Luis Guilherme Virgilio Fernandes, 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 09/13/2010.

Vigência do Projeto: 03/2011 - 02/2013 Centro de Biotecnologia	Nº de animais/espécie 125 camundongos Balb/c Fêmeas 30 hamster Golden Fêmeas
--	--

São Paulo, 14 de setembro de 2010.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

A toda minha família e amigos que sempre me
apoiaram incondicionalmente,
Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento, por me receber de braços abertos em seu laboratório, pela orientação, pela confiança depositada em meu trabalho e por sempre estar aberta à discussão de novas ideias.

À minha co-orientadora Dra. Mônica Larucci Vieira, que me ajudou desde o começo e sempre foi muito paciente, tornando-se uma grande amiga.

A todos os meus amigos do Laboratório de Biotecnologia Molecular II, tanto os que ainda estão por lá, quanto os que já se foram, Natalie, Renan, Gabriela, Rosane, Ivy, Aline, outra Aline, Gustavo, Renata, Marina, Mariana, Caio, Ana Helena, Lucas e Duda.

Ao professor Dr. Silvio A. Vasconcellos, Gisele O. Souza e especialmente à Zenaide M. de Moraes do Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, pela colaboração nos experimentos de imunoproteção e por ceder tão prontamente as culturas de leptospiras.

À professora Dra. Eliete C. Romero do Instituto Adolfo Lutz e à Dra. Karin Kirchgatter pelos soros cedidos.

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

A todos meus amigos, que considero minha segunda família.

A todos meus familiares, os quais amo incondicionalmente, minhas tias, meu tio, meus avós, meus pais e os respectivos cônjuges, minha irmã, minha primas e meu afilhado.

E em especial à minha mãe, por sempre me apoiar.

Aos meus professores da Universidade Federal de São Carlos.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia e a todos os professores que contribuíram na minha formação.

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

Obrigado.

“O espírito sem limites é o maior tesouro do homem.”

J. K. Rowling

RESUMO

FERNANDES, L. G. V. **Caracterização e avaliação imunológica de três proteínas de superfície de *Leptospira interrogans* obtidas em *Escherichia coli*.** 2012. 152 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A leptospirose é uma zoonose bastante disseminada, causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. A doença apresenta um amplo quadro de manifestações clínicas em humanos, variando desde febre, calafrios, dor de cabeça e muscular, até uma condição mais severa, conhecida como síndrome de Weil, caracterizada por hemorragia, falência renal e icterícia. No Brasil e outros países da América Latina, a doença tem se tornado um grave problema de saúde pública, sendo associada ao rápido crescimento populacional, ao aumento de favelas, às enchentes e à falta de saneamento básico. Estas condições favorecem a proliferação de roedores, principais vetores de transmissão da leptospirose. O sequenciamento do genoma completo de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, a obtenção e caracterização de proteínas potencialmente envolvidas na patogênese desta bactéria, como lipoproteínas e proteínas de membrana externa, por técnicas de DNA recombinante, podem fornecer dados importantes sobre a interação patógeno-hospedeiro, cuja compreensão pode favorecer o desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose e/ou kit diagnóstico. Desta forma, foram selecionados três genes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, LIC10973 (conhecido como OmpL1), LIC10731 e LIC10645, tendo como critério a predição de proteínas de membrana externa. O gene OmpL1 mostrou-se o mais frequente em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira*. Os fragmentos referentes aos genes foram clonados no vetor pGEM-T Easy e subclonados no vetor de expressão pAE, que acrescenta um epítipo de (His)₆ à extremidade N-terminal das proteínas recombinantes. As proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli* na forma de corpúsculos de inclusão, os quais foram solubilizados com ureia. Após purificação e diálise, foi verificado que as proteínas recombinantes estavam estruturadas, por meio de dicroísmo circular. Camundongos BALB/c foram imunizados, sacrificados, seus baços extraídos e processados para cultura de esplenócitos. O sobrenadante da cultura foi utilizado para avaliação de citocinas secretadas. Todas as proteínas recombinante promoveram ambas as respostas humoral e celular, com destaque para a resposta humoral induzida pela OmpL1 e resposta celular induzida pela rLIC10731. Resultados de imunofluorescência e proteólise por proteinase K sugerem que os três genes codificam para proteínas localizadas na membrana externa da bactéria. As proteínas recombinantes foram reconhecidas por soro de hamsters infectados por *L. interrogans*, com destaque para a reatividade da proteína OmpL1, que também foi expressivamente reconhecida por soro de pacientes diagnosticados com leptospirose. Em ensaios de adesão, a proteína OmpL1 foi capaz de se ligar ao plasminogênio, laminina e fibronectina plasmática, rLIC10645 ao plasminogênio e laminina, sendo estas interações dose-dependentes e saturáveis, ao passo que rLIC10731 se ligou ao plasminogênio e laminina de maneira dose-dependente, sendo a ligação saturável apenas para o plasminogênio. Estes resultados sugerem que estas proteínas podem estar envolvidas no processo de patogênese da bactéria, uma vez que estão expostas. A proteína OmpL1 também mostrou ligação dose-dependente e saturável ao fibrinogênio, e esta interação é capaz de reduzir a formação do coágulo de fibrina. Estes resultados podem sugerir o envolvimento desta proteína no aparecimento do quadro hemorrágico presente na leptospirose. Imunização com a proteína rLIC10731 induziu proteção parcial contra infecção letal com *L. interrogans* em hamsters.

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

ABSTRACT

FERNANDES, L. G. V. **Characterization and immunological evaluation of three surface proteins of *Leptospira interrogans* obtained in *Escherichia coli*.** 2012. 152 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Leptospirosis is a highly disseminated zoonosis, caused by pathogenic bacteria of genus *Leptospira*. The disease presents a broad spectrum of clinical manifestations in humans, ranging from fever, chills, muscular pain and headaches, to a more severe condition, known as Weil syndrome, characterized by hemorrhage, renal failure and jaundice. In Brazil and other countries in Latin America, the disease has become an important public health problem, due to the rapid growth of population, increase of slums, flooding events and the lack of sanitation. These conditions favor the proliferation of rodents, main transmission vector of leptospirosis. After annotation of the genome sequence of *L. interrogans* serovar Copenhageni, identification and characterization of proteins potentially involved in the pathogenesis of this bacterium, such as lipoproteins and outer-membrane proteins, by recombinant DNA techniques, can provide important data about the pathogen-host interactions. This comprehension may favor the development of a vaccine against leptospirosis and/or a diagnosis kit. Thus, three genes from *L. interrogans* serovar Copenhageni, LIC10973 (known as OmpL1), LIC10731 and LIC10645 were selected based on their prediction of code for proteins located in the outer-membrane. The OmpL1 gene was the most frequent one among different species and serovars of *Leptospira*. The fragments comprising the genes were cloned into pGEM-T Easy vector and subcloned in expression vector pAE, which adds an (His)₆ epitope at the N-terminus of the recombinant proteins. The recombinant proteins were expressed in *E. coli* as inclusion bodies, which were solubilized by urea. After purification and dialysis, it was verified that the recombinant proteins were correctly folded, by circular dichroism assay. BALB/c mice were immunized, sacrificed, their spleen extracted and processed for splenocytes culture. Culture supernatant was used to evaluate secreted cytokines. All recombinant proteins elicited both humoral and cellular response, specially the humoral response promoted by OmpL1 and cellular response promoted by rLIC10731. Immunofluorescence and proteinase K proteolysis results suggest that the three genes encode for proteins located in the bacterium outer-membrane. All recombinant proteins were recognized by serum of *L. interrogans* experimentally infected hamsters, prominently the OmpL1 reactivity, which was also highly recognized by positive leptospirosis serum sample. Binding assays were performed, and the OmpL1 protein binds to plasminogen, laminin and plasma fibronectin, rLIC10645 binds to plasminogen and laminin, being all these interactions dose-dependent and saturable. rLIC10731 also binds to plasminogen and laminin in a dose-dependent manner, however the binding was only saturable with plasminogen. These results suggest that the proteins may be involved in the pathogenesis process. Additionally, protein OmpL1 binds to fibrinogen, and this interaction reduces the fibrin clot formation. The data may suggest that this protein might be involved the hemorrhagic manifestations during leptospirosis. Immunization with rLIC10731 promoted partial protection against lethal infection with *L. interrogans* in hamster model.

Keywords: *Leptospira*. Leptospirosis. Recombinant proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura e composição da membrana de <i>Leptospira</i> spp.	21
Quadro 1 - Condições para crescimento das diferentes cepas de <i>E. coli</i>	41
Quadro 2 - Sequência de oligonucleotídeos empregada para amplificação dos genes nos diversos sorovares.	44
Figura 2 - Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy.	45
Figura 3 - Mapa do vetor de expressão pAE.	46
Quadro 3 - Resumo das análises por bioinformática	67
Figura 4 - Filograma gerado a partir das sequências de aminoácidos disponíveis no GeneBank.	68
Figura 5 - Visualização da extração do DNA genômico de diferentes espécies e sorovares de <i>Leptospira</i> em gel de agarose (1%).	69
Figura 6 - Análise da presença dos genes em diferentes espécies e sorovares de <i>Leptospira</i> em gel de agarose (1%).	70
Figura 7 - Análise da presença dos transcritos em diferentes espécies e sorovares de <i>Leptospira</i> em gel de agarose (1%).	71
Figura 8 - Visualização dos fragmentos de DNA amplificados referentes aos genes em estudo em gel de agarose (1%).	72
Figura 9 - Análise de restrição dos clones selecionados do vetor pGEM-T easy em gel de agarose (1%).	73
Figura 10 - Análise da extração de DNA plasmidial para seleção de clones em gel de agarose (1%).	73
Figura 11 - Visualização do ensaio de restrição das construções finais pAE-gene em gel de agarose (1%).	74
Figura 12 - Análise da expressão das proteínas recombinantes em diferentes cepas de <i>E. coli</i> por meio de SDS-PAGE (12%).	75
Figura 13 - Análise das frações de cultura bacteriana após indução de expressão das proteínas recombinantes utilizando anticorpo anti-his por <i>Western blotting</i>	76
Figura 14 - Estimativa da concentração das proteínas recombinantes purificadas em gel SDS-PAGE (12%).	77
Figura 15 - Espectros característicos de proteínas com predomínio de determinada estrutura secundária.	79

Figura 16 - Espectros gerados pela análise de dicroísmo circular para as proteínas recombinantes.....	80
Figura 17 - Produção de anticorpos IgG pela imunização de camundongos com as proteínas recombinantes.....	81
Figura 18 - Isotipagem e quantificação dos anticorpos IgG nos soros de animais imunizados com as proteínas recombinantes.....	82
Figura 19 - Detecção de anticorpos IgM e IgA contra as proteínas recombinantes nos soros dos camundongos imunizados.....	83
Figura 20 - Avaliação das respostas celulares apresentada pelos camundongos imunizados com as proteínas recombinantes.....	84
Figura 21 - Avaliação da resposta de citocinas resultante da imunização de camundongos com as proteínas recombinantes.....	85
Figura 22 - Reatividade da proteína OmpL1 com soro de hamsters e de pacientes.....	87
Figura 23 - Reatividade das proteínas rLIC10731 e rLIC10645 com soro de hamsters infectados.....	88
Figura 24 - Reatividade das proteínas rLIC10731 e rLIC10645 com soro de pacientes.	89
Figura 25 - Detecção da proteína OmpL1 em extratos de <i>Leptospira</i> spp.....	90
Figura 26 - Ensaio de proteinase K para estudo da localização celular das proteínas.	91
Figura 27 - Ensaio de imunofluorescência	92
Figura 28 - Estudo de adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular.....	94
Figura 29 - Confirmação da adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular pela utilização de anticorpo anti-his.....	95
Figura 30 - Estudo de adesão das proteínas recombinantes a componentes do soro.	97
Figura 31 - Confirmação da adesão das proteínas recombinantes a componentes do soro pela utilização de anticorpo anti-his.....	97
Figura 32 - Inibição da adesão das proteínas recombinantes aos componentes pela incubação com antissoro anti-proteína recombinante.....	99
Figura 33 - Inibição da adesão das proteínas recombinantes aos componentes pela desnaturação térmica.	100

Figura 34 - Curvas de dose-resposta da ligação da proteína recombinante OmpL1 aos componentes da matriz-extracelular e soro.	101
Figura 35 - Curvas de dose-resposta da ligação das proteínas rLIC10731 à laminina e plasminogênio.....	101
Figura 36 - Curvas de dose-resposta da ligação das proteínas rLIC10645 à laminina e plasminogênio.....	102
Figura 37 - Participação dos resíduos de açúcar na interação entre as proteínas recombinantes e a laminina.....	104
Figura 38 - Influência dos resíduos de lisina na ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio.....	105
Figura 39 - Geração de plasmina pela ativação do plasminogênio ligado às proteínas recombinantes.....	106
Figura 40 - Inibição do coágulo de fibrina pela proteína recombinante OmpL1.	107
Figura 41 - Competição entre os ligantes da proteína OmpL1.....	108
Figura 42 - Verificação da interação entre laminina e plasminogênio.....	109
Figura 43 - Competição entre os ligante das proteínas rLIC10731 e rLIC10645.....	110
Figura 44 - Inibição da ligação das leptospiros vivas aos componentes pela ação da proteína recombinante OmpL1.....	111
Figura 45 - Inibição da ligação das leptospiros vivas aos componentes pela ação das proteínas rLIC10731 e rLIC10645.....	112
Figura 46 - Cinética de sobrevivência dos animais nos experimentos de desafio.....	113
Figura 47 - Titulação do soro dos animais dos experimentos de desafio.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa molecular e PI teórico das proteínas recombinantes	74
Tabela 2 - Índices de estimulação induzidos pelas proteínas recombinantes	84
Tabela 3 - Constantes de dissociação apresentadas pelas proteínas recombinantes.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2YT-ON	Meio de cultura contendo 1% de extrato de levedura, 1,6% de peptona
ACA	Ácido aminocaproico
Amp	Ampicilina
BSA	Albumina de soro bovino
C4bp	C4 <i>binding protein</i> (proteína ligante de C4)
CAM	<i>Cell adhesion molecules</i>
CD	Dicroísmo circular
cDNA	DNA complementar
ConA	Concanavalina A
Da	Dalton
ddNTP	2', 3'didesoxirribonucleotídeo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMJH	Meio de cultura Ellinghausen–McCullough/Johnson–Harris
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
His	Histidina
Ig	Imunoglobulina
IP	Iodado de propídio
IPTG	Isopropil β -tiogalactosídeo
Kb	Kilobase
LAMP	Amplificação isotérmica
LB	Meio Luria-Bertani contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% triptona e 1% NaCl
LPHS	Síndrome pulmonar hemorrágica associada à leptospirose
LPS	Lipopolissacarídeo
MAT	Teste de microaglutinação
MLST	Análise de sequências <i>multiloci</i>
OMP	<i>Outer-membrane protein</i> (proteína de membrana externa)

OPD	o-fenilenodiamina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
Pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	PBS contendo 0,05% Tween-20
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PI	Ponto isoelétrico
PK	Proteinase K
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluor
RBS	Sítio de ligação ao ribossomo
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _r	RNA ribossômico
Rpm	Rotação por minuto
RT	Transcriptase reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TA	Temperatura de anelamento
TAE	Tris-acetado EDTA
TBE	Tris-borato EDTA
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
uPa	Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
X-gal	5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosídeo
VNTR	análise <i>multiloci</i> de número de sequências em tandem repetidas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Microbiologia e biologia celular de <i>Leptospira</i> spp.	20
1.2 Classificação e taxonomia	22
1.3 Genômica e biologia molecular	23
1.4 Leptospirose	24
1.5 Epidemiologia da doença	26
1.6 Diagnóstico e tratamento	28
1.7 Patogenicidade e Fatores de Virulência	30
1.8 Vacinas e candidatos vacinais	34
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivos gerais	37
2.2 Objetivos específicos	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Cepas de Bactérias e soros utilizados	38
3.2 Componentes biológicos	39
3.3 Análises por bioinformática	39
3.4 Obtenção das bactérias competentes	40
3.5 Preparação de DNA genômico de <i>Leptospira</i> spp.	41
3.6 Extração de RNA de culturas de <i>Leptospira</i> spp. e reação de transcrição reversa ...	42
3.7 Estudo da presença dos genes e dos respectivos transcritos entre diferentes cepas de <i>Leptospira</i> spp.	43
3.8 Clonagem das sequências	43
3.9 Clonagem no vetor pGEM-T Easy	44
3.10 Subclonagem no vetor de expressão pAE	46
3.11 Sequenciamento dos clones	47
3.12 Estudo de indução das proteínas recombinantes	48
3.13 Purificação e diálise das proteínas recombinantes	48
3.14 Espectroscopia circular (CD)	49
3.15 Preparação do extrato de <i>E. coli</i>	50
3.16 Imunização	50
3.17 Detecção de anticorpos por ELISA	51
3.18 Avaliação da resposta celular e avaliação de citocinas	52
3.19 Avaliação de citocinas	53
3.20 Detecção de anticorpos IgG em soros de pacientes diagnosticados com leptospirose e soro de hamsters experimentalmente infectados.	54
3.21 Cálculo da especificidade da reação de detecção de IgG humano anti-OmpL1	54

3.22 Preparo dos extratos proteicos de <i>Leptospira</i> spp.	54
3.23 Imunoblotting	55
3.24 Avaliação da localização celular das proteínas nativas.....	55
3.24.1 <i>Imunofluorescência</i>	55
3.24.2 <i>Acessibilidade por proteinase K</i>	56
3.25 Ensaio de adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular e soro	57
3.26 Curva de dose-resposta da ligação das proteínas recombinantes aos componentes	58
3.27 Ensaio de inibição da ligação pela incubação com antissoro anti-proteína recombinante.....	58
3.28 Ensaio de inibição da ligação pela desnaturação térmica das proteínas recombinantes	59
3.29 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio	59
3.30 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes à laminina	60
3.31 Ensaio de atividade enzimática da plasmina.....	60
3.32 Inibição do coágulo de fibrina	61
3.33 Interferência entre os componentes na ligação às proteínas recombinantes	61
3.34 Inibição da ligação das leptospirosas vivas ao componente	62
3.35 Preparo de bacterina para ensaios de imunoproteção	62
3.36 Ensaio de imunoproteção	63
3.37 Teste de Microaglutinação (MAT).....	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 Análise de bioinformática dos genes selecionados	65
4.2 Análise da presença dos genes e respectivos transcritos entre os diversos sorovares de <i>Leptospira</i>	68
4.3 Clonagem dos genes.....	71
4.4 Expressão das proteínas recombinantes.....	74
4.5 Purificação e diálise das proteínas recombinantes	77
4.6 Dicroísmo circular	78
4.7 Avaliações imunológicas	81
4.8 Reatividade com soro de hamster e pacientes.....	86
4.9 Presença das proteínas em diferentes espécies e sorovares de <i>Leptospira</i> spp.....	89
4.10 Estudo da localização celular.....	90
4.11 Adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular e soro	93
4.11.1 <i>Matriz extracelular</i>	93
4.11.2 <i>Componentes do soro</i>	95
4.12 Efeito dos anticorpos e desnaturação térmica na ligação das proteínas recombinantes aos componentes	98

4.13	Curvas de dose-resposta.....	100
4.14	Caracterização da ligação das proteínas recombinantes à laminina	103
4.15	Caracterização da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio	104
4.16	Conversão do plasminogênio ligado às proteínas recombinantes à plasmina	105
4.17	Inibição da formação do coágulo de fibrina.....	106
4.18	Interferência na ligação entre os componentes	108
4.19	Inibição da ligação das leptospiras vivas aos componentes	110
4.20	Ensaio de imunoproteção pela imunização com a proteína rLIC10731.....	112
5	CONCLUSÕES.....	116
	REFERÊNCIAS	118
	APÊNDICES	137
	APÊNDICE A – Início das construções finais dos genes clonados no vetor de expressão pAE	137
	APÊNDICE B - Artigo publicado em periódico	138

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microbiologia e biologia celular de *Leptospira* spp.

As leptospiras são bactérias finas, enroladas helicoidalmente, bastante móveis, possuindo em média de 6 a 20 μm de comprimento (HAAKE et al., 2000; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; LEVETT, 2001). São espiroquetas, ou seja, divergiram cedo na evolução das bactérias (PASTER et al., 1991), e podem compreender tanto espécies saprofíticas quanto patogênicas, contidas no gênero *Leptospira*, que pertence à família *Leptospiraceae*, ordem Spirochaetales (FAINE et al., 1999). Podem ser distinguidas morfológicamente de outras espiroquetas com base no formato único de suas extremidades em gancho ou ponto de interrogação (FAINE et al., 1999; LI et al., 2000).

Essas bactérias não são coradas pelo método de Gram, sendo utilizada a impregnação por sais de prata ou observação direta em microscópio de campo escuro ou contraste de fase para sua visualização (FAINE et al., 1999; LEVETT et al., 2001).

As leptospiras possuem crescimento relativamente lento tanto em meio de cultura líquido quando sólido. O crescimento ótimo destas bactérias é observado em temperaturas entre 28 e 30 °C em meio suplementado com ácidos graxos de cadeia longa, vitamina B1 e B12 e sais de amônio (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Os ácidos graxos de cadeia longa são a única fonte de carbono e energia conhecida, e são degradados por meio de β -oxidação. O meio de cultura mais usado para cultivo das leptospiras é o meio Ellinghausen–McCullough/Johnson–Harris (EMJH), que contém ácido oleico, albumina sérica e polisorbato (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

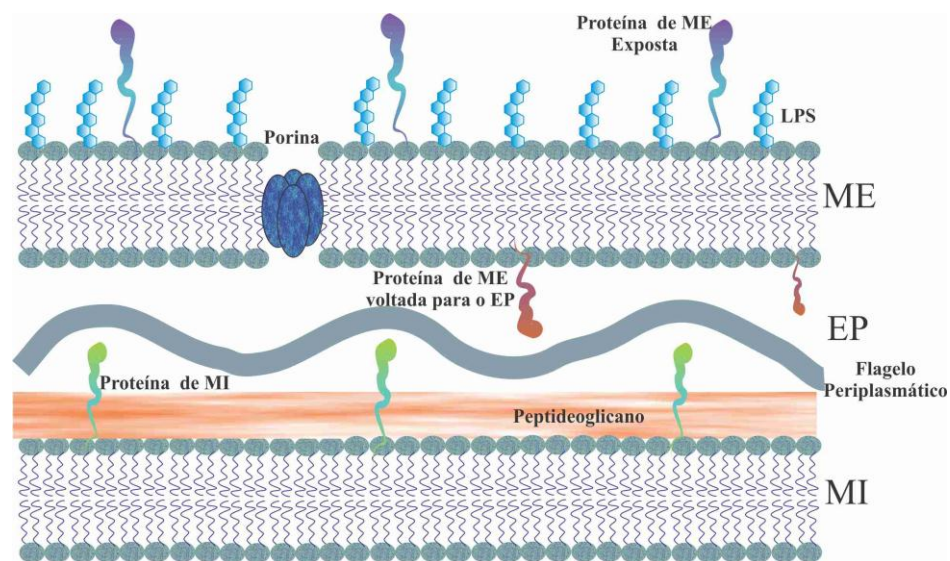
Algumas cepas patogênicas, como *L. interrogans*, podem sobreviver em meios pobres em nutrientes, como solo úmido e água fresca por longos períodos, tendo concentração de sal, pH e viscosidade como fatores críticos (TRUEBA et al., 2004). Entretanto, a espécie *L. borgpetersenii* não sobrevive fora do hospedeiro, e análises genômicas indicam que isto se deve à perda de genes cruciais para sobrevivência fora do hospedeiro, devido ao genoma menor desta espécie (BULACH et al., 2006).

Visualização microscópica e ensaios em placas de poliestireno demonstraram que as leptospiras são capazes de se agregar e formar biofilme, e este fenômeno é proposto como

sendo um mecanismo empregado por essas bactérias para sobreviver em diversos meios (RISTOW et al., 2008).

As leptospiras possuem estruturas que compartilham características tanto de bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (Figura 1). A membrana dupla e a presença de lipopolissacarídeo (LPS) são características de bactérias Gram-negativas, ao passo que a forte associação da membrana plasmática com a parede celular composta de peptídeoglicano é uma característica semelhante a de bactérias Gram-positivas (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; HAAKE et al., 2000; LEVETT, 2001). A presença de LPS é um grande diferencial em relação a outras espiroquetas, tais como *Treponema pallidum*, *Treponema denticola*, e *Borrelia burgdorferi*, as quais não possuem LPS (BOON HINCKLEY et al., 2005; HAAKE; MATSUNAGA, 2010).

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



As leptospiras apresentam uma membrana citoplasmática (MI, membrana interna), um espaço periplasmática (EP) no qual se localizam os flagelos periplasmáticos e uma membrana externa (ME), composta por proteínas expostas e lipopolissacarídeos (LPS). A forte associação da camada de peptídeoglicano com a MI é uma característica de bactérias Gram-positivas, e a presença de uma membrana externa e LPS é uma característica de bactérias Gram-negativas.

O LPS das leptospiras é estruturalmente e imunologicamente similar ao LPS de outras bactérias Gram-negativas. Entretanto, é cerca de 12 vezes menos tóxico do que o de *E. coli* (FAINE et al., 1999). O lipídeo A das leptospiras contém características pouco comuns, incluindo uma metilação do fosfato contido no dissacarídeo de glucosamina (QUEGEWIRTH et al., 2004).

A mobilidade das leptospiras depende da presença de dois flagelos periplasmáticos, ou endoflagelos (CHARON; GOLDSTEIN, 2002), que partem de cada extremidade da célula (LIAO et al., 2009) e terminam no centro da mesma (BHARTI et al., 2003). A mobilidade destas bactérias é relevante à sua biologia básica e, apesar de ser um evento comum também às leptospiras saprofitas, pode ser considerada um fator de virulência. Leptospiras patogênicas recém-isoladas possuem uma movimentação translacional e rotacional maior em comparação com as cepas mantidas *in vitro* (ELLIS et al., 1983). Esta mobilidade permite que estes micro-organismos migrem através de nichos de aspecto geliforme, como tecidos conjuntivos (LI et al., 2000).

A inativação do gene da flagelina *flaB* em *L. biflexa* por meio de recombinação homóloga resultou na ausência do endoflagelo, e conseqüentemente perda da movimentação da bactéria (PICARDEAU; BRENOT; SAINT GIRONS, 2001).

1.2 Classificação e taxonomia

Tradicionalmente, as leptospiras eram divididas em duas espécies sorológicas distintas, com a maioria das espécies patogênicas (ou supostamente patogênicas) agrupadas no complexo “interrogans”. Todas outras foram classificadas dentro do complexo “biflexa”, que inicialmente continha as cepas saprofitas (BHARTI et al., 2003; KMETY; DIKKEN, 1993; PLANK; DEAN, 2000).

O gênero *Leptospira* tem sido dividido e classificado em mais de 250 sorovares de acordo com o teste de microaglutinação (MAT) (PLANK; DEAN, 2000). Esta classificação sorológica é baseada na expressão de LPS expostos, sendo que as diferenças estruturais na porção de carboidrato do LPS determinam a diversidade antigênica entre os diferentes sorovares (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010), os quais são classificados em sorogrupos, de acordo com os antígenos em comum (PLANK; DEAN, 2000).

A classificação genética atual, baseada em análise de hibridização de DNA, indica que existam pelo menos 19 espécies, sendo destas 13 patogênicas e 6 saprofitas (BRENNER et al., 1999; LEVETT, 2001). Sete destas espécies, *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. kirschneri* e *L. alexanderi* são os principais causadores da leptospirose (AHMED et al., 2006). Entretanto, aproximadamente metade dos sorovares patogênicos são classificados em *L. interrogans* ou *L. borgpetersenii* (BRENNER et al., 1999).

A reclassificação das leptospiros usando determinantes genéticos fornece informações taxonômicas importantes, mas é independente da classificação sorológica estabelecida, que é mais conhecida por epidemiologistas e clínicos. Portanto, as designações de sorogrupos e sorovares continuarão a ser usadas (BHARTI et al., 2003), funcionando como uma complementação à classificação genética (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). A independência entre sorogrupo em relação à classificação genética sugere que os genes determinantes dos sorotipos (sorovares) podem ter sido transferidos lateralmente entre diferentes espécies (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; LEVETT, 2001).

Análise filogenética do gene 16S do RNA ribossômico (RNAr) sugere que espécies de *Leptospira* se dividem em três grupos distintos, a saber, espécies patogênicas, intermediárias e saprofíticas (LEVETT et al., 2006; PEROLAT et al., 1998).

Baseando-se nesta classificação, o grupo das espécies saprofíticas (*L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. kmetyi*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, e *L. yanagawae*) forma o ramo mais afastado filogeneticamente, enquanto o grupo das espécies patogênicas engloba 8 espécies (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, and *L. alstonii*). Outro ramo evolucionário é compreendido pelo grupo das chamadas espécies intermediárias (*L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii*, *L. licerasiae*), o qual contém espécies de patogenicidade pouco clara (BHARTI et al., 2003; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; LEVETT, 2001).

Atualmente, o sequenciamento do genoma de algumas espécies de *Leptospira* permitiu a introdução de inúmeros métodos para genotipagem, que incluem análise *multiloci* de número de sequências em tandem repetidas (VNTR) (CAIMI et al., 2010; SALAUN et al., 2006) e análise de sequências *multiloci* (MLST) (AHMED et al., 2006; CAIMI et al., 2010; THAIPADUNGPANIT et al., 2007), um método de classificação que é baseado em sequências parciais de genes *housekeeping* e pode constituir futuramente um método padrão para genotipagem de *Leptospira* assim como já é para outras bactérias.

1.3 Genômica e biologia molecular

Um grande avanço no entendimento da biologia básica das leptospiros e do processo de patogênese destas bactérias foi o sequenciamento do genoma completo de duas espécies patogênicas, *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, e da espécie saprofítica *L. biflexa* (BULACH et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2004a, b; PICARDEAU et al., 2008; REN et al., 2003).

De maneira geral, os genomas possuem um conteúdo C+G entre 35 e 41% e dois cromossomos circulares com tamanho de aproximadamente 4 Mb e 300 kb, não apresentando plasmídeos naturais. Um terceiro replicon de 74 kb, chamado de p74, foi identificado em *L. biflexa* (PICARDEAU et al., 2008), a qual também pode possuir um quarto replicon circular, um bacteriófago LE1 (BOURHY et al., 2005; SAINT GIRONS et al., 1990). Este bacteriófago não é encontrado nas leptospiros patogênicas (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009) e é a base para o único plasmídeo *shuttle vector* desenvolvido entre *E. coli* e *L. biflexa* (GIRONS et al., 2000); porém este vetor não é replicativo nas leptospiros patogênicas (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

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

A espécie *L. borgpetersenii* possui um genoma cerca de 700 kb menor que *L. interrogans* e com muito mais pseudogenes, o que sugere que *L. borgpetersenii* sofreu um processo de redução de genoma (BULACH et al., 2006). A perda de genes parece ter feito com que esta espécie não conseguisse sobreviver fora do hospedeiro e, portanto, dependa de contato direto entre hospedeiros, normalmente gado, para sua transmissão (BULACH et al., 2006).

A maioria dos genes de *Leptospira* spp. não possui ortólogos no genoma de outras espiroquetas, confirmando a grau de divergência genética das leptospiros em relação a outros membros do filo (BULACH et al., 2006).

1.4 Leptospirose

A leptospirose é a zoonose mais disseminada globalmente, acometendo tanto humanos quanto animais, principalmente cães, gado e porcos (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Mais de 500.000 casos de leptospirose severa são reportados a cada ano, com taxas de mortalidade que excedem 10% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). Esta doença representa um grande problema econômico para a saúde pública (FAINE et al., 1999; KO et al., 1999; LEVETT, 2001).

A infecção pelas cepas patogênicas comumente ocorre por meio de contato direto com urina de animais contaminados ou indiretamente por meio de água e solo contaminados

(BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999). Praticamente todo mamífero pode servir como carreador das leptospiras, albergando estas bactérias nos túbulos proximais do rim, o que acarreta na liberação das leptospiras pela urina. As leptospiras entram no organismo por meio de cortes ou abrasão na pele, ou pelas membranas mucosas do olho, nariz e garganta (PLANK; DEAN, 2000).

Ratos são considerados os carreadores principais na maioria dos casos reportados de leptospirose em humanos, excretando altas concentrações de leptospiras na urina meses após a infecção inicial (cerca de 10^7 organismos/mL). Os humanos são considerados os hospedeiros acidentais, sofrendo de infecção aguda e em algumas vezes fatal (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; FAINE et al., 1999; KO et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Descrições típicas da doença incluem um quadro sintomático bifásico e um fulminante (HEATH JR; ALEXANDER; GALTON, 1965). No quadro bifásico, a fase inicial aguda ou septicêmica é caracterizada por bacteremia que dura por aproximadamente uma semana. A maioria dos casos apresenta uma doença febril de início súbito; muitos relatos clínicos têm indicado a presença de febre em praticamente todos os casos relatados de leptospirose (TAKAFUJI et al., 1984). Muitas pessoas infectadas por *Leptospira* spp. podem apresentar uma manifestação subclínica com sintomas bastante brandos, e assim não procuram atendimento médico (BHARTI et al., 2003). A infecção assintomática é comum, principalmente em regiões onde a doença é endêmica.

A resolução dos sintomas pode coincidir com a fase imune, na qual os anticorpos começam a ser produzidos, acompanhados pela excreção de leptospiras pela urina. Entretanto, a febre pode reaparecer após 3-4 dias, produzindo o quadro bifásico. Na maioria dos casos, o quadro bifásico não é diferenciável de outras doenças febris (BHARTI et al., 2003).

Na fase inicial, a leptospirose também é caracterizada por calafrios, dores de cabeça e muscular, podendo ocorrer a progressão dos sintomas para uma complicação generalizada, conhecida como Síndrome de Weil, que ocorre em 5-15% dos casos, com taxas de mortalidade de 5-40% (FAINE et al., 1999; KO et al., 1999; LEVETT, 2001; PLANK; DEAN, 2000). Este quadro é caracterizado por falência de órgãos, incluindo icterícia, meningite, hemorragia, disfunção renal e hepática e colapso cardiovascular. Injúria vascular e lesões endoteliais são observadas em todos os órgãos afetados (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; FAINE et al., 1999; KO et al., 1999).

A severidade da doença depende da cepa ou sorovar infectante de *Leptospira* envolvidos, tamanho do inóculo, pelo menos para algumas cepas, bem como a idade e

situação de saúde e imune do indivíduo infectado (FAINE et al., 1999; LEVETT 2001). Adicionalmente, a forma severa da doença está normalmente associada com os sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni e Lai (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

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

Uma das características deste quadro é o sangramento intenso dos pulmões e dano tecidual agudo, indicando que a patogênese desta síndrome pode ser diferente da síndrome de Weil (KO et al., 1999). No entanto, esta síndrome pode ser subdiagnosticada em regiões altamente endêmicas (MCBRIDE et al., 2005; SEGURA et al., 2005). Os sintomas podem ser moderados e pouco específicos, incluindo dor no peito, tosse e dispneia, que aparecem geralmente entre o quarto e sexto dia da doença. Além disso, a severidade da forma respiratória da leptospirose não está associada à presença de icterícia. Os índices de mortalidade de LPHS podem chegar a 30-70%, e a morte se dá em até 72 horas após o aparecimento dos sintomas (NICODEMO et al., 1997; YERSIN et al., 2000).

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

1.5 Epidemiologia da doença

A leptospirose é considerada a zoonose mais distribuída globalmente (LEVETT, 2001) por causa da vasta gama de animais, principalmente mamíferos, que são infectados por leptospiras patogênicas. Conforme mencionado, os roedores são os principais reservatórios de manutenção da bactéria na maioria dos casos (BHARTI et al., 2003). Este grupo não inclui apenas ratos e camundongos, mas também ratazanas, musaranhos, ouriços e marsupiais.

Porém, alguns roedores, como hamsters e porquinhos-da-índia, são bastante suscetíveis à leptospirose, e podem servir como modelo animal para leptospirose humana. Anfíbios, cobras e peixes também foram mostrados como animais com potencial de albergar leptospiras (MINETTE, 1983), mas a significância destes achados em relação à transmissão da doença é desconhecida (LANGSTON; HEUTER, 2003).

Quando as leptospirosas estão fora dos hospedeiros, elas não se replicam (GREENE; MILLER; BROWN, 1998), porém, dependendo das condições, elas podem permanecer viáveis por vários meses, quando as condições ambientais são ótimas.

Ademais, a leptospirose causa uma série de manifestações crônicas em animais de pecuária, particularmente gado, porcos, ovelhas e cabras, que estão associadas com queda de produção, natimortos e abortos (GROOMS, 2006; LILENBAUM, 2006; RAMOS; SOUZA; LILENBAUM et al., 2008). Uveíte recorrente em cavalos devido à leptospirose é um sintoma bastante frequente (BARWICK et al., 1998), e está relacionado a uma reação autoimune gerada pelas proteínas LruA e LruB de *Leptospira* spp. (VERMA et al., 2010).

A leptospirose em humanos é sempre adquirida de uma fonte animal; a transmissão de humano para humano é, para fins práticos, de pouca importância epidemiológica (FAINE et al., 1999). A doença possui um impacto significativo na saúde pública por todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento (BHARTI et al., 2003; GANOZA et al., 2010; LEVETT, 2001; MCBRIDE et al., 2005).

A incidência da doença em humanos é maior nos trópicos do que em regiões temperadas, porém a transmissão ocorre tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, nos quais a doença ocorre tanto em áreas urbanas quanto rurais (BHARTI et al., 2003). Surtos da doença em países desenvolvidos são geralmente associados com exposição ocupacional (BENSCHOP et al., 2009; DESAI et al., 2009), turismo ou esportes aquáticos (MORGAN et al., 2002; STERN et al., 2010). Países em desenvolvimento são bastante afetados pela doença, com cerca de meio milhão de casos reportados anualmente e taxa de mortalidade em torno de 5-10% (MCBRIDE et al., 2005).

A leptospirose era principalmente considerada uma doença ocupacional, associada a atividades como mineração, tratamento de esgoto, atividades de pecuária, medicina veterinária e empreitadas militares (BHARTI et al., 2003). A importância relativa da exposição ocupacional tem diminuído desde a implementação de medidas de proteção. Porém, em países tropicais, a exposição em virtude de atividades ocupacionais como cultivo irrigado de arroz e outras atividades agrícolas ainda é significativa, assim como a exposição às leptospirosas em razão de atividades corriqueiras, especialmente associadas a chuvas torrenciais e sazonais (RUSSELL et al., 2003; SANDERS et al., 1999; TREVEJO et al., 1998).

As condições ambientais afetam bastante a transmissão das leptospirosas (BHARTI et al., 2003) e sua diversidade é limitada em ilhas, como Barbados, onde apenas 4 sorovares patogênicos foram identificados (LEVETT et al., 1998; MATTHIAS; LEVETT, 2002), e em

ambientes urbanos onde os principais reservatórios em potencial são ratos e cachorros (KO et al., 1999; VINETZ et al., 1996).

Dados do Ministério da Saúde relatam em média 3500 casos confirmados de leptospirose no Brasil entre 1997 e 2011, com uma taxa de mortalidade média de 10%. Porém estes dados são subestimados, principalmente em virtude dos sintomas pouco específicos da doença e infecção assintomática em algumas regiões endêmicas (CRUZ; VARGAS; LOPES, 2009).

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

1.6 Diagnóstico e tratamento

Um pré-requisito para o controle de doenças infecciosas é a disponibilidade de testes diagnósticos funcionais, os quais devem ser confiáveis, sensíveis e baratos (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007).

O teste de microagutinação (MAT) é considerado o teste padrão para diagnóstico de leptospirose, sendo específico para sorovares ou sorogrupos de *Leptospira* spp. (FAINE et al., 1999); porém não permite o diagnóstico na fase inicial da doença, pois este teste detecta a presença de anticorpos contra *Leptospira* spp., principalmente do tipo IgG, os quais são gerados em 5-7 dias após a exposição ao patógeno (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007).

Basicamente, diluições seriadas do soro do possível paciente com leptospirose são misturadas com suspensões vivas de *Leptospira* spp., e o título do soro é considerado a diluição máxima que fornece 50% de aglutinação (LANGSTON; HEUTER, 2003). Embora tenha alta sensibilidade e especificidade (CUMBERLAND; EVERARD; LEVETT, 1999; BHARTI et al., 2003), este teste é demorado, feito apenas em laboratórios de referência e exigindo pessoal altamente capacitado para execução, podendo apresentar variação dos resultados entre diferentes laboratórios (BHARTI et al., 2003; CHAPPEL et al., 2004; VIJAYACHARI; SEHGAL, 2006).

Em adição, esse teste não consegue diferenciar entre anticorpos resultantes de infecção ou vacinação, o que é um problema no que tange a animais, uma vez que vacinas veterinárias são compostas de uma preparação de leptospiros mortas ou inativadas (NAIMAN et al., 2001; VERNEL-PAUILLAC; MERIEN, 2006; WANG; JIN; WEGRZYN, 2007).

Existem algumas técnicas para detecção das leptospiras na fase inicial da doença, para a qual o teste MAT não permite diagnóstico. Durante a leptospiremia, denotada pela presença de leptospiras no sangue, estas podem ser visualizadas nas amostras clínicas por microscopia de campo escuro, porém este método é pouco sensível e pouco específico (LEVETT, 2001; TURNER, 1970), além de interpretações errôneas, uma vez que as leptospiras podem ser confundidas com fibrina, a qual apresenta um movimento Browniano semelhante ao das espiroquetas (FAINE et al., 1999; TURNER, 1970).

O isolamento das bactérias em amostras de sangue e urina também é possível; no caso de amostras de sangue, estas devem ser retiradas o mais breve possível, logo após o aparecimento dos sintomas, pois, como mencionado, a leptospiremia ocorre nos primeiros estágios da doença e dura até o final da primeira semana após o aparecimento dos sintomas da fase aguda (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001). Neste procedimento, uma ou duas gotas de sangue são inoculadas em meio semi-sólido contendo 5-fluorouracil, um antibiótico para seleção de leptospiras (JOHNSON; ROGERS, 1964). No entanto, o crescimento das bactérias é lento em um isolamento primário (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001), o que dificulta o diagnóstico na fase inicial da doença, onde o tratamento é mais eficaz (TOYOKAWA; OHNISHI; KOIZUMI, 2011; TULSIANI et al., 2010).

O diagnóstico da leptospirose pela amplificação de DNA desta bactéria contido no sangue, urina, fluido cerebrospinal e humor aquoso também pode ser realizado (BROWN et al., 2003; CHU et al., 1998; LEVETT, 2001). Muitos protocolos de PCR para detecção de DNA de leptospira em materiais clínicos foram desenvolvidos desde 1990, e a maioria mostrou possuir alta sensibilidade (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Muitos ensaios de PCR objetivando a amplificação de genes do RNAr 16S e 23S (HOOKEY, 1992; MERIEN et al., 1992; MURGIA et al., 1997) bem como aqueles que codificam OmpL1, DNA girase, RpOB, proteínas Lig e LipL32, além de elementos repetitivos no DNA (JOUGLARD et al., 2006; LA SCOLA et al., 2006; LEON et al., 2006; LIU et al., 2006; PALANIAPPAN et al., 2005; REITSTETTER et al., 2006; ROMERO; YASUDA et al., 2006) têm sido desenvolvidos. Um protocolo de PCR baseado na amplificação do gene da flagelina e do gene *secY* está descrito no Manual da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003).

O aumento da sensibilidade deste método diagnóstico tem sido obtido por meio da utilização de PCR quantitativo usando sondas TaqMan (SLACK et al., 2007) ou SYBR green (LEVETT et al., 2005). Um trabalho recente descreve a detecção de leptospiras pela amplificação do DNA genômico utilizando a técnica de amplificação isotérmica (LAMP),

com uso de oligonucleotídeos que amplificam o gene do RNAr 16S (SUWANCHAROEN et al., 2012).

Anticorpos IgM contra leptospiras são detectados durante a primeira semana da doença (BHARTI et al., 2003; ADLER et al., 1980; GUERREIRO et al., 2001) e muitos ensaios de ELISA foram propostos para detecção destes anticorpos. Os antígenos imobilizados podem ser lisados totais de leptospiras ou então proteínas recombinantes específicas, como LipL32, Loa22 (CHALAYON et al., 2011), OmpL1 (DONG et al., 2008; SUN et al., 2011), Hsp60 (NATARAJASEENIVASAN et al., 2011) e LigA (SRIMANOTE et al., 2008).

Além destes protocolos para diagnóstico laboratorial, em 2010 foi divulgado pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) um método diagnóstico rápido, baseado em cartão, utilizando o antígeno LigA de leptospira. Esse método permite a detecção de anticorpos anti-LigA em apenas uma gota de sangue do paciente, sendo o resultado bastante rápido, em torno de 15 minutos (FUNDAÇÃO OSWALD CRUZ, 2010).

Depois de diagnosticada a leptospirose, o tratamento envolve a utilização de antibióticos como oxitetraciclina, doxiciclina e penicilina (BABER; STUART, 1946; MCCLAIN et al., 1984; RUSSELL, 1958). A terapêutica com antibiótico parece reduzir o avanço dos sintomas (a exemplo de duração da hipertermia, tempo de normalização da função renal e tempo de hospitalização) e a ocorrência de sequelas, podendo prevenir a ocorrência de infecção sintomática e a evolução para as manifestações mais graves da doença, por isso seu uso é recomendado (MCCLAIN et al., 1984; SEHGAL et al., 2000; TAKAFUJI et al., 1984; WATT et al., 1988), embora ainda seja um assunto controverso, uma vez que muitos casos de leptospirose severa se resolvem espontaneamente (BHARTI et al., 2003; BRETT-MAJOR; COLDREN, 2012; GRIFFITH; HOSPENTHAL; MURRAY, 2006; KATZ et al., 2001; VINETZ, 2003;).

Nos casos graves, nos quais há complicações renais, respiratórias ou hemorrágicas, os pacientes devem ser encaminhados a hospitais que disponham de capacidade para realizar procedimentos como diálise e terapia intensiva (LEVETT et al., 2011).

1.7 Patogenicidade e Fatores de Virulência

Um melhor entendimento dos mecanismos de patogênese e fatores de virulência envolvidos está atualmente sob investigação com a disponibilidade das sequências genômicas, ferramentas genéticas e modelos animais que podem ser usados para diferentes estudos.

Os mecanismos moleculares da patogênese são ainda pouco compreendidos, sendo que atualmente poucos fatores de virulência que contribuem para a patogênese da doença foram identificados. De maneira geral, candidatos a fatores de virulência incluem LPS (que é um fator de virulência de bactérias gram-negativas), hemolisinas, proteínas de membrana externa (OMPs), bem como moléculas de adesão, uma vez que já é bem descrito que a interação do patógeno com a matriz extracelular pode desempenhar um papel central na colonização dos tecidos do hospedeiro (LJUNGH; MORAN; WADSTROM, 1996; PATTI et al., 1994).

O reconhecimento das leptospiros (e, por conseguinte, de seu componente majoritário, o LPS) em células murinas é mediado por receptores TLR4 (Toll-like receptor) e TLR2, ao passo que em células humanas esse reconhecimento se dá apenas por TLR2 (NAHORI et al., 2005; WERTS et al., 2001). Por isso, foi sugerido que o lipídio A do LPS das leptospiros, quimicamente particular (QUE-GEWIRTH et al., 2004), não é reconhecido por receptores TLR4 humanos, e por isso falha em ativar essa rota imune. Esta falta de reconhecimento em células humanas, mas não em murinas, pode resultar em uma ineficiência em montar uma resposta imune apropriada, levando à suscetibilidade à bactéria.

Mutações por *transposons* em genes da biossíntese de LPS afetaram a virulência das leptospiros. Um dos poucos mutantes obtidos (no gene *LA 1641*) sintetiza uma forma menor do LPS e é incapaz de causar infecção letal em hamsters (MURRAY et al., 2009a). Sabe-se que anticorpos anti-LPS conferem imunidade passiva em alguns modelos animais contra um número específico de cepas e espécies de *Leptospira* (FAINE et al., 1999).

Toma et al. (2011) demonstraram que *L. interrogans* é capaz de sobreviver, replicar e escapar de macrófagos de camundongo, o que possibilita sua disseminação em órgãos alvos. Li et al. (2010) mostraram que as leptospiros fagocitadas por macrófagos humanos são capazes de escapar dos fagossomos para o citossol, onde elas proliferam e ativam a via de apoptose dessas células, por meio da proteína se superfície Loa22 (WU et al., 2011), sabidamente um fator de virulência (RISTOW et al., 2007).

O uso de zebrafish (*Danio rerio*) como modelo para compreensão da patogênese das *Leptospiras* spp. foi recentemente descrito. Embriões deste peixe, que são bem transparentes, permitem a observação de células vivas em microscópio e também foram empregados em pesquisa de patogênese microbiana (NEELY; PFEIFER; CAPARON, 2002). Embriões infectados com *L. interrogans* se mostraram assintomáticos durante o início da infecção. Neste modelo, as leptospiros foram fagocitadas e sobreviveram dentro dos macrófagos, os quais se moveram para longe do local inicial da infecção, sugerindo um mecanismo

alternativo pelo qual a disseminação das leptospiros pode ser facilitada (DAVIS; HAAKE; RAMAKRISHNAN, 2009). Recentemente, foi identificada uma proteína, Mce, responsável pela adesão das leptospiros a macrófagos e sua respectiva invasão (ZHANG et al., 2012).

As leptospiros patogênicas provavelmente estão em contato com altas concentrações de espécies reativas de oxigênio induzidas pelo hospedeiro durante a resposta imune inata. Eshghi et al. (2012) mostraram que o gene *KatE*, anotado como a única catalase de *Leptospira* spp. patogênicas, codifica uma catalase funcional, que garante um aumento de sobrevivência das cepas patogênicas em relação as saprofíticas; em soma, a inativação do gene *KatE* nas cepas patogênicas diminuiu drasticamente a viabilidade destas bactérias na presença de H₂O₂ extracelular e reduziu a virulência em modelo animal de infecção aguda.

O fato das leptospiros formarem biofilme (RISTOW et al., 2008) pode representar um mecanismo de escape do sistema imune. De fato, biofilmes podem constituir uma barreira contra células e moléculas efetoras imunes, incluindo anticorpos e sistema complemento, representando um dos principais mecanismos de infecção persistente por *Pseudomonas aeruginosa* (KHARAZMI et al., 1991).

Muitos estudos em relação à aderência das leptospiros focam na ligação destas a componentes da matriz extracelular. Muitas cepas de *Leptospira* spp. se aderem a componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo I, colágeno tipo IV, laminina e fibronectina (ATZINGEN et al., 2008; BARBOSA et al., 2006). Até o presente, muitas adesinas alocadas na membrana externa de leptospira já foram descritas, como as proteínas LigA e LigB (CHOY et al., 2007), proteínas da família Len (STEVENSON et al., 2007), Lsa21 (ATZINGEN et al., 2008), LipL32 (HOKE et al., 2008) Lp95 (ATZINGEN et al., 2009), TlyC (CARVALHO et al., 2009), LipL53 (OLIVEIRA et al., 2010), OmpL37 (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010), Lsa63 (VIEIRA et al., 2010b), Lsa66 (OLIVEIRA et al., 2011), Lsa20 (MENDES et al., 2011), Lsa33 (DOMINGOS et al., 2012) e Lsa30 (SOUZA et al., 2012).

Moléculas de adesão celular (CAMs) são receptores de superfície presentes em células eucarióticas e medeiam interações célula-célula ou célula-matriz extracelular. Muitas bactérias invadem tecidos do hospedeiro por meio de sua habilidade de se ligar às CAMs (BOYLE; FINLAY, 2003; FINLAY; CROSSART, 1997). Nosso grupo descreveu a primeira proteína recombinante de *L. interrogans*, rLIC10365, com a capacidade de estimular o aumento da expressão de ICAM-1 em células endoteliais de cordão umbilical (VIEIRA et al., 2007). Outras proteínas recombinantes de *L. interrogans* foram caracterizadas quanto sua capacidade de aumentar a expressão de moléculas CAMs (GOMEZ et al., 2008).

Foi provado que as *Leptospira* spp. conseguem se ligar ao plasminogênio por meio de inúmeros receptores em sua superfície (VIEIRA et al., 2009; VIEIRA et al., 2010a), sendo este componente passível de ser convertido em sua forma enzimaticamente ativa, a plasmina, na superfície da bactéria. *L. interrogans* virulentas, quando recobertas por plasmina, foram capazes de degradar fibronectina, um componente da matriz extracelular, o que pode ser um fator que contribui para a invasividade das leptospiras.

Foi demonstrado também que a geração de plasmina na superfície das leptospiras interfere na deposição de C3b e IgG, provavelmente por meio da degradação destes componentes, o que diminui o processo de opsonização, contribuindo para a evasão imune da bactéria (VIEIRA et al., 2011).

O primeiro estudo reportando a evasão do sistema complemento por leptospiras patogênicas foi feito por Meri et al. (2005). Os autores demonstraram que as cepas de leptospiras resistentes ao soro são capazes de se ligar ao Fator H, o qual, quando ligado à superfície das leptospiras, permanece ativo funcionalmente, atuando como cofator na clivagem de C3b pelo Fator I (MERI et al., 2005).

Além de recrutar Fator H em sua superfície, as leptospiras também possuem a capacidade de se ligarem a C4bp (C4 binding protein), um inibidor da via clássica e das lectinas do complemento. O C4bp ligado às leptospiras mantém sua atividade de cofator, atuando na clivagem de C4 mediada por Fator I, indicando que a aquisição deste regulador do complemento pode contribuir para a resistência ao soro pelas leptospiras (BARBOSA et al., 2009). É válido ressaltar que a atenuação em cultura das cepas virulentas não afeta sua capacidade de se ligar a Fator H e C4bp (CINCO, 2010).

Wang et al. (2012) mostraram que cinco prováveis hemolisinas de *L. interrogans* (Sph1, Sph2, Sph3, HlpA e TlyA) são secretadas e possuem atividade hemolítica em eritrócitos de ovelhas, além de induzirem resposta inflamatória por meio da secreção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α por macrófagos humanos e de camundongo.

Um melhor entendimento dos mecanismos de patogênese e identificação de fatores de virulência está atualmente sob investigação. No genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004a) foram identificadas mais de 200 proteínas possíveis de membrana externa, as quais podem estar envolvidas na patogênese da bactéria.

1.8 Vacinas e candidatos vacinais

Vacinas compostas de leptospiras inativadas ou atenuadas (bacterinas) têm sido reportadas há mais de 50 anos. Algumas dessas vacinas foram testadas em gado (BRAMEL; SCHEIDY, 1956; HANSON; TRIPATHY; KILLINGER, 1972; HOAG; BELL, 1955; TEIGLAND, 1956) e cachorros (MARSHALL; KERR, 1974; WILSON et al., 1977). Estas vacinas também foram testadas em humanos voluntários (CHAPMAN; FAINE; ADLER et al., 1990; SHENBERG; TORTEN, 1973; TORTEN et al., 1973).

Bacterinas contra leptospirose em humanos foram introduzidas logo após a descrição da doença no Japão, e têm sido usadas neste país (KOIZUMI; WATANABE, 2005; YANAGIHARA et al., 2007), Cuba (SANCHEZ et al., 2002; MARTINEZ et al., 2004) e França (LAURICHESSE et al., 2007; RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2004); uma vacina baseada em preparação de membrana externa de *Leptospira* spp. tem sido usada na China (YAN et al., 2003).

Porém, imunização com essas bacterinas causa efeitos adversos, como dor no local da aplicação, náusea e febre (FAINE et al., 1999). A resposta imune provocada por essas vacinas é praticamente toda direcionada contra os LPS, os quais são os componentes majoritários da membrana da bactéria (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001), por isso não induzem resposta cruzada, uma vez que os LPS são os determinantes antigênicos dos mais de 250 sorovares (BHARTI et al., 2003; HAAKE; MATSUNAGA, 2010), e não induzem memória, sendo necessária revacinação.

Como a leptospira é uma bactéria principalmente extracelular, a proteção contra este patógeno era imaginada como sendo exclusivamente humoral (RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2004; SCHOONE et al., 1989). Sabe-se que anticorpos anti-LPS conferem imunidade passiva em alguns modelos animais contra um número específico de cepas e espécies de *Leptospira* (FAINE et al., 1999). Entretanto, foi demonstrado que a imunidade celular é requerida para uma proteção completa contra leptospirose bovina (NAIMAN et al., 2002).

Em humanos, quando as células mononucleares de sangue periférico provenientes de indivíduos saudáveis que se recuperaram de leptospirose são estimuladas com leptospiras, uma expansão de linfócitos T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ ocorre (TUERO; VINETZ; KLIMPEL, 2010). Então, uma vacina ideal contra leptospirose deve induzir níveis significativos de ambas as respostas, humoral e celular.

O primeiro candidato vacinal recombinante foi reportado em 1999 (HAAKE et al., 1999). A lipoproteína exposta LipL41 e a porina transmembrana OmpL1 foram clonadas e

expressas em *E. coli*. Hamsters imunizados com frações de membrana de *E. coli* contendo as proteínas recombinantes apresentaram uma sobrevivência significativa (71%), apresentando um efeito sinérgico.

A estratégia utilizada para identificar candidatos vacinais a partir de dados obtidos com o sequenciamento de genomas tais como o da *Neisseria meningitidis*, sorogupo B (PIZZA et al., 2000) e do *Streptococcus pneumoniae* (WIZEMANN et al., 2001) foi muito bem sucedida. Neste sentido, o genoma da espiroqueta *L. interrogans* sorovar Copenhageni foi sequenciado (NASCIMENTO et al., 2004a, b) e mais 200 proteínas de membrana externa foram identificadas, entre elas 170 novas lipoproteínas.

Proteínas de superfície são alvos potenciais para induzir resposta imune durante a infecção e podem também mediar o processo de adesão inicial às células do hospedeiro. Portanto, proteínas de membrana externa bem conservadas são alvos vacinais promissores (CULLEN et al., 2002; HAAKE et al., 1999), porque elas teriam a vantagem de induzir uma resposta imune cruzada entre diferentes espécies e sorovares.

A lipoproteína exposta LipL32 é o antígeno majoritário da membrana externa das leptospiros patogênicas (HAAKE et al., 2000; MALMSTROM et al., 2009), sendo bastante conservada (CULLEN et al., 2002; HAAKE et al., 2000). Esta proteína recombinante misturada com adjuvante de Freund ou hidróxido de alumínio e saponina não conferiu proteção em modelo animal gerbo. Porém, quando o gene *lipL32* foi clonado em um vetor para vacina de DNA, 60% dos gerbos sobreviveram, em comparação com 35% do grupo controle (BRANGER et al., 2005). Imunização de hamsters com LipL32 administrada com hidróxido de alumínio não conferiu proteção contra infecção letal com *L. interrogans* sorovar Manilae (LUCAS et al., 2011).

Mycobacterium bovis (BCG) expressando LipL32 induziu imunidade protetora em 56% dos hamsters imunizados, enquanto apenas 12% dos animais controle sobreviveram, e esta proteção foi esterilizante (SEIXAS et al., 2007). Em suma, a eficácia da imunização com LipL32 por meio de vacina de DNA ou BCG é baixa, e vacinas de subunidades não produzem imunidade protetora.

Recentes avanços na geração de mutantes de leptospiros permitiu a análise de possíveis fatores de virulência. Mutante deficiente para o gene *lipL32*, ou seja, que não expressava LipL32, não apresentou atenuação de virulência em modelo animal (MURRAY et al., 2009b).

O primeiro fator de virulência descrito em *Leptospira* spp. foi a proteína Loa22, a qual também foi a primeira lipoproteína contendo um domínio OmpA descrita (KOIZUMI;

WATANABE, 2003). Entretanto, a proteção induzida pela imunização de hamsters com Loa22 (33-50%) não foi significativa (YAN et al., 2010).

Nosso grupo vem tentando identificar novos antígenos vacinais, ou seja, proteínas conservadas preditas como sendo localizadas na membrana externa de *Leptospira* spp.. Seguindo esse racional, foram selecionados três genes (LIC10973, conhecido como OmpL1, LIC10731 e LIC10645) a partir do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, todos preditos em codificar proteínas localizadas na membrana externa da bactéria.

Assim, um melhor entendimento da resposta imune provocada pelas proteínas recombinantes referentes aos genes do presente estudo, bem como a caracterização funcional das mesmas, pode fornecer dados importantes para o desenvolvimento de uma vacina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Os objetivos do presente trabalho são estudar três genes de *L. interrogans* e caracterizar as respectivas proteínas recombinantes.

2.2 Objetivos específicos

Estudar a presença dos genes LIC10973 (OmpL1), LIC10731 e LIC10645 em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira*, bem como a conservação das proteínas referentes a estes genes.

Obter as respectivas proteínas recombinantes em *Escherichia coli* e caracterizá-las quanto à reatividade frente a soros de pacientes diagnosticados com leptospirose e hamsters experimentalmente infectados.

Avaliar a localização das proteínas referentes aos genes em *Leptospira* spp.

Avaliar a interação das proteínas recombinantes com componentes da matriz extracelular e soro, bem como caracterizar a natureza e afinidade destas interações.

Avaliar a resposta imune humoral e celular destas proteínas recombinantes em modelo animal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas de Bactérias e soros utilizados

As cepas patogênicas atenuadas de *Leptospira* utilizadas no presente estudo foram *L. interrogans* sorovar Canicola cepa Hound Utrech IV, *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M 20, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae cepa RGA, *L. interrogans* sorovar Pomona cepa Pomona, *L. borgpetersenii* sorovar Castellonis cepa Castellon 3, *L. borgpetersenii* sorovar Whitcombi cepa Whitcomb, *L. kirshneri* sorovar Grippytyphosa cepa Moskva V, *L. kirschneri* sorovar Cynoptery cepa 3522C, *L. santarosai* sorovar Shermani cepa 1342 K, *L. noguchii* sorovar Panama cepa CZ 214 e a cepa não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc.

As bactérias foram cultivadas a 28 °C sob condições aeróbias em meio EMJH líquido (Difco®, BD, Franklin Lakes, NJ ,USA) (ELLINGHAUSEN JR; MCCULLOUGH, 1965; JOHNSON; ROGERS, 1967) com 10% (v/v) de soro de coelho, enriquecido com L-asparagina (m/v: 0,001%), cloreto de magnésio (m/v: 0,001%), peptona (m/v: 0,03%) e extrato de carne (m/v: 0,001%). As cepas virulentas *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 e *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm também foram utilizadas. As culturas de *Leptospira* spp. são rotineiramente mantidas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, SP, Brasil. As leptospiros se duplicam aproximadamente a cada 16 horas e seu crescimento é lento no isolamento primário, de modo que as culturas são mantidas por até cerca de 13 semanas antes de serem descartadas (LEVETT, 2001). As leptospiros de subcultura são cultivadas por em média 14 dias, e em seguida são novamente subcultivadas.

Para obtenção dos soros de hamsters infectados, hamsters sírios Golden machos recém-desmamados foram infectados pela via intraperitoneal com cerca de 1×10^3 *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm. Os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital após o aparecimento dos sintomas, como perda de peso e mobilidade, aproximadamente 5 dias após a infecção experimental. A infecção foi confirmada pelo teste de microaglutinação.

Amostras de soros pareados de pacientes diagnosticados com leptospirose utilizadas neste estudo fazem parte de uma soroteca e foram cedidas pela Dra. Eliete C. Romero, do instituto Adolfo Lutz. Amostras de soros de pacientes diagnosticados com doenças febris não

relacionadas foram obtidas da coleção de soros do Laboratório de Imunoepidemiologia, SUCEN, SP, Brasil, e foram gentilmente cedidas pela Dra. Karin Kirchgatter.

A linhagem de *E. coli* DH5 α (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizada para as etapas de clonagem e três linhagens de *E. coli* foram empregadas para ensaios de expressão: BL21 SI (Salt Induced) (Invitrogen), que possui o gene da T7 RNA polimerase integrado ao genoma sob controle do promotor proU indutível por NaCl (BHANDARI; GOWRISHANKAR, 1997), BL21 (DE3) (Invitrogen) que também possui o gene da T7 RNA polimerase, mas dirigida pelo promotor lac UV5, o qual é induzido por IPTG (isopropil-B-D-tiogalactopiranosídeo) (STUDIER et al., 1990), e (DE3) Star pLysS (Invitrogen), a qual possui um plasmídeo pLysS que expressa uma enzima que degrada a polimerase T7, impedindo a expressão basal na ausência do indutor, além de possuir o gene da RNase E mutado e inoperante, o que aumenta a estabilidade do mRNA nestas cepas (INVITROGEN, 2012).

3.2 Componentes biológicos

As macromoléculas empregadas nos estudos de adesão foram compradas de diferentes empresas. Laminina-1 e colágeno tipo IV são derivados do sarcoma murino da membrana basal Engelbreth-Holm-Swarm, fibronectina celular é derivada de fibroblastos humanos, fibronectina plasmática e colágeno tipo I foram isolados de cauda de rato, e todos estes componentes são oriundos da empresa Sigma (Sigma-Aldrich Corporate, St Louis, MO, EUA), incluindo ECM gel, fibrinogênio humano e os controle negativos fetuína, BSA e gelatina. Plasminogênio, purificado de plasma humano e fator H humano foram comprados da EMD Chemicals, Inc. (São Diego, CA, EUA). C4bp foi obtido da Complement Technology, Inc. (Tyler, Texas, EUA).

3.3 Análises por bioinformática

Os genes foram selecionados do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, disponível no servidor público <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/> (NASCIMENTO et al., 2004a). Esta seleção teve como base a localização celular das proteínas hipotéticas codificadas por estes genes, que foi feita com a utilização do programa PSORT - <http://psort.nibb.ac.jp/> (NAKAI; KANEHISA, 1991; NAKAI; HORTON, 1999) e CELLO- <http://cello.life.nctu.edu.tw/> (YU et al., 2006) . A presença de sinal de clivagem ou lipidação

foi avaliada com auxílio do programa LipoP - <http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/> (JUNCKER et al., 2003). O peptídeo sinal também foi definido com auxílio do software SignalP - <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.

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

Todas as sequências disponíveis no GeneBank foram utilizadas para estudar a conservação e similaridade das proteínas em diferentes espécies de *Leptospira*, com auxílio do software de alinhamento múltiplo CLUSTAL 2.1, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

A identificação de domínio transmembrana formando barril- β foi feita pelo software on-line TMBETA - <http://psfs.cbrc.jp/tmbeta-net/> (GROMIHA; AHMAD; SUWA, 2005) e a identificação de domínios transmembrana do tipo α -hélice foi feita pelo TMHMM Server v. 2.0 - <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>.

Os cálculos de massa molecular e ponto isoelétrico (PI) das proteínas recombinantes resultantes do cassete de expressão foram feitos a partir da sequência de aminoácidos com auxílio o software ProtParam (GASTEIGER, 2006).

3.4 Obtenção das bactérias competentes

Para a obtenção das bactérias competentes utilizadas nas diferentes etapas de clonagem e expressão, foi utilizado o método descrito por Hanahan (1983). A cepa de interesse foi primeiramente estriada em placa contendo meio sólido apropriado e incubada à temperatura apropriada por 16 horas (Quadro 1).

Em seguida, uma colônia foi coletada e inoculada em 5 mL de meio de cultura, e então o inóculo foi incubado por 16 horas à temperatura ideal sob constante agitação. Dois mL da cultura saturada foram diluídos em 100 mL de meio de cultura e incubados novamente por cerca de 1 hora e 30 minutos sob agitação. A densidade ótica foi monitorada em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 *pro*, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) no comprimento de onda de 600 nm. Quando a densidade ótica atingiu um valor compreendido entre 0,4 e 0,6, o frasco de cultura foi transferido para banho de gelo. À cultura foi adicionado

1 mL de MgCl₂ 1 M, seguido de incubação em banho de gelo por aproximadamente 15 minutos. A cultura foi dividida em 4 tubos de 50 mL gelados para centrifugação, a qual foi realizada por 13 minutos a 5.000 rpm (rotação por minuto) e 4 °C.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 20 mL de tampão RFI (100 mM KCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM acetato de potássio; 10 mM CaCl₂; 15% glicerol) gelado, seguido de incubação em banho de gelo por 15 minutos. A amostra foi novamente centrifugada e o sobrenadante resultante foi descartado, sendo o sedimento ressuspensionado em 2 mL de tampão RFII (10 mM KCl; 75 mM CaCl₂; 10 mM MOPS; 15% glicerol) gelado. A amostra foi aliqüotada a cada 50 µL em tubos de 1,5 mL em banho de gelo seco, e armazenadas a -80 °C.

Quadro 1 - Condições para crescimento das diferentes cepas de *E. coli*

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

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

3.5 Preparação de DNA genômico de *Leptospira* spp.

Foi extraído o material genético das cepas patogênicas atenuadas e da cepa saprofítica. Para tal, foram coletados 1,5 mL da cultura de leptospiros em microtubo, e então este foi centrifugado por 2 minutos a 13.000 rpm à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi repetido para outros 1,5 mL. O *pellet* formado após a centrifugação foi ressuspensionado em 467 µL de tampão Tris-EDTA (TE), sendo então adicionados 30 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 3 µL de 20 mg/mL de proteinase K. A mistura foi homogeneizada e incubada por 1 hora a 37 °C. Foi adicionado igual volume de uma solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), sendo então a mistura agitada até as fases se misturarem completamente. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos, e então o sobrenadante foi recuperado. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a esta foi adicionado igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Novamente as amostras foram agitadas, centrifugadas a 14.000 rpm por cinco minutos, e o sobrenadante foi coletado. Ao sobrenadante recuperado foi adicionado 1/10 volume de acetato de sódio 3 M e 0,6

volume de isopropanol. A solução foi homogeneizada e acondicionada em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. Após centrifugação, o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 70%, sendo subsequentemente centrifugado a 11.000 rpm por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O etanol foi desprezado e 50 μL de água estéril foram adicionados para eluição do DNA. A concentração e qualidade do DNA genômico foram determinadas por leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

3.6 Extração de RNA de culturas de *Leptospira* spp. e reação de transcrição reversa

Para a reação de transcrição reversa e subsequente geração de cDNA, o RNA total foi isolado utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. Foram centrifugados 20 mL de culturas saturadas de *Leptospira* spp. durante 20 minutos, a 5.000 rpm e $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 2 mL de Trizol; então a solução resultante foi centrifugada por 10 minutos a 12.000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 400 μL de clorofórmio. A solução foi homogeneizada por meio de agitação manual por 15 segundos, incubada por 3 minutos à temperatura ambiente e então centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm e $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A fase superior (aquosa) foi transferida a um novo tubo, ao qual foi adicionado 1 mL de isopropanol, para precipitação do material genético. A solução foi invertida algumas vezes, incubada por meia hora a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a seguir centrifugada por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 2 mL de etanol 75%. A solução foi invertida duas vezes e centrifugada por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco à temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspenso em 40 μL de água livre de RNase (DEPC treated-Water, Invitrogen). O RNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm. Para a reação de transcrição reversa, utilizou-se o kit “*SuperScript® III First Strand*” (Invitrogen). Nesta reação, 2 μg de RNA foram tratados com *Dnase I Amplification Grade* e tampão fornecido pelo fabricante em um volume final de 20 μL . Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, foi adicionado EDTA 2,5 mM e feito aquecimento da amostra a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. A amostra foi dividida em duas frações de 10 μL . A cada fração foram adicionados hexâmeros randômicos (25 ng) e desoxirribonucleotídeos (dNTPs) 1 mM, sendo então estas frações incubadas por 5 minutos a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ e transferidas ao gelo por cerca de 2 minutos. Adicionaram-se MgCl_2 5 mM, DTT 10 mM, RNase OUT 40 U, *SuperScript III RT* 200 U 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 gelo.

Cabe ressaltar que em uma das frações foi omitida a enzima *SuperScript III*, funcionando como um controle de contaminação genômica nas amostras (RT-). As amostras foram tratadas com RNase H 1 U a 37 °C por 20 minutos e armazenadas a -20 °C.

3.7 Estudo da presença dos genes e dos respectivos transcritos entre diferentes cepas de *Leptospira* spp.

Foram utilizados oligonucleotídeos F (*forward*) e R (*reverse*) desenhados com auxílio do programa Generunner® (Hastings Software, Inc - <http://www.generunner.net/>) para reação de PCR (*polymerase chain reaction*). A reação de PCR para avaliar a presença dos genes e transcritos relativos a estes genes em espécies e sorovares de *Leptospira* foi realizada utilizando-se tampão de PCR 1X; 0,2 mM dNTP; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM de cada oligonucleotídeo (F e R); 2,5 U Taq polimerase (todos reagentes acima citados da Invitrogen); 100 ng de DNA genômico ou 2 µL da reação de transcrição reversa das cepas de *Leptospira* supramencionadas para um volume final de 50 µL. As temperaturas de anelamento utilizadas foram determinadas de acordo com o programa Generunner® (Hastings software, Inc). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700.

Os oligonucleotídeos utilizados para esta análise são os mesmos utilizados para a clonagem, o que justifica a presença das sequências de restrição adicionadas à extremidade 5' de cada oligonucleotídeo, segundo descrito no Quadro 2.

Foi também desenhado um par de oligonucleotídeos para amplificação do gene 16S de *Leptospira*, para verificação da integridade das amostras:

16S F: GCGTCTTAAACATGCAAG

16S R: ACTTAACCCAACATCTCACG

3.8 Clonagem das sequências

Os fragmentos referentes aos genes LIC10973 (OmpL1), LIC10731 e LIC10645 foram obtidas pela reação de PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, utilizando as mesmas condições de PCR realizadas para o estudo da presença dos genes. Os insertos foram amplificados sem a sequência do peptídeo sinal e foram adicionados os sítios de restrição aos oligonucleotídeos conforme descrito no Quadro 2.

Cabe ressaltar que os sítios de restrição foram escolhidos tendo como critério a ausência dos mesmos na sequência do gene a ser clonado, a fim de garantir a integridade do inserto.

A especificidade da amplificação e o tamanho das sequências de interesse foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (40mM Tris-acetato e 1 mM EDTA) corado com Gel Red™ (Biotium, Inc, Hayward, CA, EUA). Os insertos de interesse foram recortados do gel, purificados com auxílio do kit “*GfxPCR DNA and gel band purification*” (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) e os produtos obtidos foram quantificados em espectrofotômetro.

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

Gene ID	Oligonucleotídeo sintético	TA	Amplicon
LIC10973 (OmpL1)	F: 5' <u>GGATCC</u> AAAACATATGCAATTGTAGG 3' R: 5' <u>GGTACCT</u> TAGAGTTCGTGTTTATAACC 3'	60°C	903 pb
LIC10731	F: 5' <u>GGATCC</u> CGAGATGGAGAAGTGGCGCTT 3' R: 5' <u>GGTACCT</u> TATTTTTTTTGGATGAACTAAATGAGG 3'	65°C	1164 pb
LIC10645	F: 5' <i>CTCGAG</i> ATTACGAATTGTAAAAAAGA 3' R: 5' <i>AAGCTT</i> TTAACGAACTAGTACAGTCG 3'	60°C	1212 pb

Notas: Gene ID: identificação do gene no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni; Abreviaturas: F, “forward”; R, “reverse”; TA, temperatura de anelamento utilizada; pb, pares de base. As sequências que correspondem aos sítios de restrição *BamHI/KpnI* estão sublinhadas e as sequências que correspondem aos sítios de restrição *XhoI/HindIII* estão em itálico.

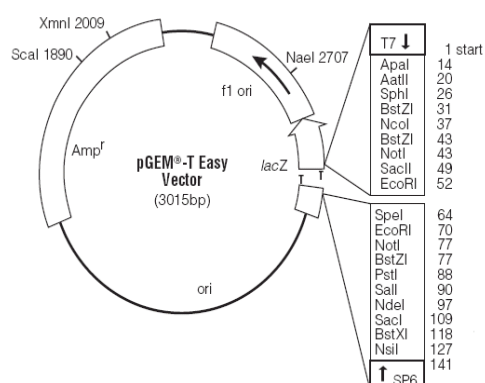
3.9 Clonagem no vetor pGEM-T Easy

O vetor pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) (Figura 2) possui uma quebra de sequência com extremidades 3'T sobressalentes, o que possibilita a ligação do fragmento amplificado, uma vez que algumas polimerases acrescentam uma adenina à extremidade 3' do *amplicon*, possibilitando o anelamento e posterior ligação do arcabouço açúcar-fosfato. A presença do inserto interrompe o gene *LacZ*, o qual é essencial para a degradação de um substrato cromogênico, chamado X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo); assim, colônias positivas para o inserto são deficientes para esta degradação, ficando incolores, ao contrário das azuis, as quais degradam o substrato.

A reação de ligação foi realizada segundo a reação padrão estabelecida pelo fabricante. Os produtos de ligação foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* DH5 α previamente tornadas competentes pelo método descrito por Hanahan (1983).

Para a transformação foram utilizados 5 μ L do produto de ligação para 50 μ L de bactérias competentes, que foram descongeladas em gelo. Incubou-se por 30 minutos em banho de gelo e depois se submeteu a amostra a um choque térmico, por 2 minutos a 42 $^{\circ}$ C. Retornou-se ao banho de gelo por mais 5 minutos e acrescentou-se 350 μ L de meio de cultura Luria Bertani – LB (0,5% extrato de levedura; 1% tripton; 1% NaCl). Incubou-se a 37 $^{\circ}$ C, por 1 hora, sob agitação. A amostra foi plaqueada em meio LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina, 100 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) e 50 mg/mL de X-gal, sendo estes dois últimos adicionados à placa utilizando-se o método de espalhamento superficial. Incubou-se a 37 $^{\circ}$ C por uma noite.

Figura 2 - Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy.



ori: origem de replicação. Amp^r: gene de resistência a ampicilina. lacZ: gene para metabolismo de lactose (β -galactosidase).

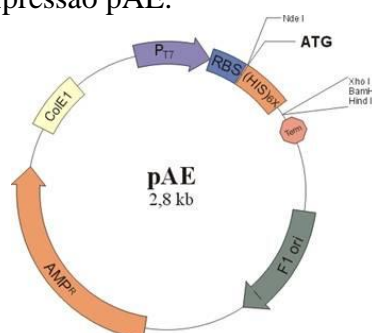
Fonte: Promega (2012)

As colônias presumivelmente positivas foram escolhidas por seleção azul/branco, inoculadas em 5 mL de LB com 100 μ g/mL de ampicilina e incubadas a 37 $^{\circ}$ C, sob agitação, por uma noite. Para obtenção do DNA plasmidial (pGEM-T Easy contendo o inserto de interesse) utilizou-se o kit “*PlasmidPrep mini spin*” (GE Healthcare) seguindo as orientações do fabricante. Foi verificada a presença de insertos nos plasmídeos obtidos, por meio de eletroforese em gel de agarose, após a digestão dos mesmos com as enzimas de restrição que reconhecem os sítios contidos nas extremidades 5’ dos pares de oligonucleotídeos.

3.10 Subclonagem no vetor de expressão pAE

Os insertos clonados foram removidos dos plasmídeos recombinantes (pGEM-T Easy/inserto) por digestão com as enzimas de restrição conforme recomendação do fabricante. O vetor de expressão pAE (Figura 3) (RAMOS et al., 2004) foi digerido com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para obtenção dos insertos, em tampão que garantia máximo de eficiência para as duas enzimas utilizadas concomitantemente. Após digestão, tanto os insertos quanto o vetor de expressão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e posteriormente purificados pelo kit “*GFX PCR DNA and Gel Band Purification*” (GE Healthcare). O vetor pAE foi desenvolvido para expressar a proteína recombinante contendo uma cauda de 6 resíduos de histidina na região N-terminal e é um sistema de alta expressão que é controlado pelo promotor do fago T7, sendo que a expressão da proteína recombinante só ocorre na presença da T7 RNA polimerase.

Figura 3 - Mapa do vetor de expressão pAE.



P_{T7}: promotor. (His)₆: sequência codificadora para seis resíduos de histidina. RBS: sítio de ligação ao ribossomo. ATG: códon de início da transcrição. Term: região de terminação de transcrição.

Fonte: Ramos (2004).

Os diferentes fragmentos foram inseridos no vetor pAE digerido. A ligação dos insertos ao vetor foi realizada em uma reação contendo inserto:vetor em uma proporção molar de 5:1. Incubaram-se o inserto e o vetor por 10 minutos a uma temperatura de 65 °C seguido de incubação em banho de gelo por 5 minutos. Acrescentaram-se 5U de T4 DNA ligase (GE Healthcare) e incubou-se por 2 horas a 37 °C.

Bactérias competentes *E. coli* DH5 α foram transformadas com os produtos de ligação, plaqueadas em LB/Amp e incubadas a 37 °C por uma noite. As colônias randomicamente selecionadas foram então inoculadas em 5 mL de meio de cultura com 100 μ g/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C, sob agitação, por 16 horas. Para a seleção dos

clones corretos, 300 µL dos inóculos foram centrifugados a 12.000 rpm, por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 50 µL de água deionizada. Adicionaram-se 20 µL de tampão de carregamento 10X (0.19% azul de bromofenol, 0.42% xileno cianol e 50% glicerol) e 28 µL de solução fenol-clorofórmio 1:1. Homogeneizou-se a amostra com o auxílio do *vortex*. A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm 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 Easy.

3.11 Sequenciamento dos clones

Preparações plasmidiais dos clones positivos foram obtidas e o DNA foi submetido a sequenciamento pelo método da terminação de cadeia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), a partir dos oligonucleotídeos T7 e pAER (abaixo), utilizando-se sequenciador automático ABI (PE Applied Biosystems, Foster city, CA) para a verificação dos insertos clonados. O método da terminação de cadeia emprega o uso de 2', 3'-didesoxirribonucleotídeos (ddNTPs) marcados por fluoróforos que interrompem a amplificação aleatoriamente, pois impedem a formação da ligação fosfodiéster com o nucleotídeo adjacente e possibilitam a leitura automatizada por meio de um feixe de laser gerando um cromatograma.

Conforme recomendação da *Applied Biosystems*, a reação de amplificação dos fragmentos a serem sequenciados foi realizada num volume final de 20 µl 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 e 60 °C por 4 minutos. A seguir, a mistura foi precipitada com isopropanol 75% e centrifugada 50 minutos a 11.500 rpm à temperatura ambiente. O precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, seco a vácuo em centrifuga e ressuspensionado para aplicação em 15 µl de formamida HiDi (Applied Biosystems). Os cromatogramas obtidos foram analisados com o auxílio dos programas públicos: Chromas (<http://www.mb.mahidol.ac.th/pub/chromas/chromas.htm>) e Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) (ALTSCHUL et al., 1990, 1997).

T7 “forward” TAATACGACTCACTATAGGG

pAER reverso: CAGCAGCCAACTCAGTTCCT

3.12 Estudo de indução das proteínas recombinantes

Três cepas de *E. coli* foram empregadas para ensaios de expressão: BL21 SI, BL21 (DE3) e BL21 (DE3) Star pLysS. Bactérias competentes *E. coli* BL21 SI (Salt Induced) foram transformadas com o plasmídeo recombinante conforme já mencionado 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 uma noite. As culturas saturadas foram diluídas (1:25) em um novo meio, incubadas e monitoradas periodicamente a partir de leitura em espectrofotômetro até atingir uma densidade ótica a 600 nm (DO600nm) entre 0,6 e 0,8 que denota o início da fase exponencial de crescimento.

A indução da expressão dos genes heterólogos foi realizada adicionando-se 5, 50 e 500 mM de NaCl e incubando as culturas, novamente, à mesma temperatura por um período de 3 horas. Para as bactérias competentes *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS e *E. coli* BL21 (DE3), o procedimento foi semelhante, porém o meio utilizado foi o LB contendo 100 µg/mL de ampicilina para a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) ou 100 µg/mL de ampicilina e 100 µg/mL de cloranfenicol para a cepa BL21 (DE3) Star pLysS. A temperatura de incubação foi de 37 °C e a indução da expressão dos genes heterólogos foi realizada adicionando-se 0,01; 0,1 e 1 mM de IPTG e incubando as culturas, novamente, à mesma temperatura por um período de 3 horas. A seguir as bactérias foram centrifugadas (5.000 rpm, 15 minutos, 4°C) e os sedimentos ressuspensos em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8; 200 mM NaCl; 200 µg/mL lisozima; 2 mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluor) 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 tampão de desnaturação (10 mM Tris-HCl pH8; 150 mM NaCl; 8M ureia; 5 mM β-mercaptoetanol), e alíquotas do sobrenadante da sonicação e do sedimento solubilizado foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% SDS (SDS-PAGE).

3.13 Purificação e diálise das proteínas recombinantes

Todas as três proteínas recombinantes foram purificadas na bancada por meio de cromatografia de afinidade ao metal, utilizando-se uma coluna impregnada com níquel. A purificação partiu de 400 mL de cultura induzida de *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS, cujo

sedimento formado após sonicação e centrifugação foi ressuspenso em 50 mL de tampão de desnaturação e agitado por cerca de 12 horas para garantir a total solubilização do *pellet*. A purificação das proteínas foi feita por diluição por gotejamento (fluxo de 1 mL por minuto) em 2 L de tampão *refolding* contendo 20 mM Tris-HCl pH 8 e 500 mM NaCl, sob agitação, a fim de diluir o agente desnaturante e fazer com que a proteína recombinante se renature.

A resina “Chelating Sepharose” (GE Healthcare) previamente carregada com Ni²⁺ foi equilibrada com tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM NaCl 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, as proteínas recombinantes foram eluídas com a concentração de 1 M de imidazol. As frações de todas as etapas da purificação foram coletadas e analisadas em gel de SDS-PAGE. As alíquotas que continham a proteína recombinante OmpL1 (rLIC10973) foram dialisadas em PBS (tampão fosfato-salino, 0,137 M NaCl, 0,27 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) 0,01% glicina a 4 °C. As alíquotas que continham a proteína recombinante rLIC10731 e rLIC10645 foram dialisadas em tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl e 0,01% glicina a 4 °C. Foram realizadas quatro trocas do tampão de diálise.

A concentração das proteínas recombinantes foi estimada em SDS-PAGE 12%, comparando-se as bandas referentes a elas com bandas compreendendo massas pré-estabelecidas de albumina (BSA – *Bovine Serum Albumin*), e utilização do software de análise de imagens de eletroforese Gel Quantifier Image Analysis (GelQuant, versão 2.7.0), para quantificação das bandas referentes a cada proteína recombinante de acordo com o padrão utilizado (BSA), por meio de comparação densitométrica das bandas. As imagens dos géis para análise densitométrica e quantificação foram feitas em um fotodocumentador MiniBIS Pro (DNR Imaging System, Ltda).

3.14 Espectroscopia circular (CD)

As amostras de proteínas foram dialisadas em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, apropriado para a análise por não conter íons cloro, os quais interferem na leitura do equipamento (JHONSON JR, 1990). Os espectros de CD foram expressos em termos de elipicidade molar residual:

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

onde Φ é elipicidade, C é a concentração da proteína, I é o caminho óptico e N é o número de resíduos de aminoácidos na proteína (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

As medições de espectroscopia circular foram feitas a 20 °C em um Espectropolarímetro Jasco J-810 (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan) 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 leituras. Os valores de elipsidade molar residual foram utilizados para predição da porcentagem de estruturas secundária pelo software K2D3, disponível em <http://www.ogic.ca/projects/k2d3/> (LOUIS-JEUNE; ANDRADE-NAVARRO; PEREZ-IRATXETA, 2011).

3.15 Preparação do extrato de *E. coli*

Para preparação do extrato de *E. coli* foi utilizada a mesma cepa pela qual a proteína recombinante foi expressa. A cepa selvagem foi inoculada em 400 mL de meio LB e deixada para aumento de massa por 16 horas a 37 ° C. Todo o volume de cultura saturada foi centrifugado a 5.000 rpm por 20 minutos, e o *pellet* resultante foi ressuscitado em 40 mL de tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8; 200 mM NaCl; 200 µg/mL lisozima; 2 mM PMSF e 1% Triton X-100) e lisado em banho de gelo, por sonicação.

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

3.16 Imunização

Cinco camundongos BALB/c fêmeas (idade variando de 6 a 8 semanas) foram imunizados com 10 µg de cada proteína recombinante ou PBS (controle negativo) em suspensão contendo *Alhydrogel* (2% Al(OH)₃, Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca) como adjuvante, na concentração final de 12%, por via subcutânea. Foram realizadas três imunizações com intervalos de duas semanas. Os animais foram sangrados via plexo retro-orbital em intervalos de duas semanas, referentes a cada imunização. O sangue coletado foi incubado a 4 °C por 30 minutos e depois a 37 °C por 30 minutos, sendo então centrifugado por 5 minutos a 5.000 rpm, para separação do soro, o qual foi cuidadosamente coletado e armazenado a -20 °C.

3.17 Detecção de anticorpos por ELISA

A detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-OmpL1, anti-rLIC10731 e anti-rLIC10645 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), compondo um total de 250 ng de proteína recombinante por poço. Incubou-se a placa à temperatura ambiente por uma noite. Após incubação, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% (PBS-T). A placa foi então incubada com solução de bloqueio (PBS-T acrescido de leite desnatado 10%), 200 µL por poço, durante 2 horas a 37 °C. Foram feitas diluições seriada de 1:200 a 1:409.600 dos soros de camundongos em solução de bloqueio acrescida de extrato de *E. coli* (10% v/v). Incubaram-se estes soros por 1 hora para que ocorresse a adsorção dos anticorpos inespecíficos em relação às proteínas recombinantes, ou seja, anticorpos gerados contra contaminantes de *E. coli* que porventura estivessem contidos nas alíquotas de proteína recombinante purificada (GRUBER; ZINGALES, 1995). Para cada antígeno foi feito um “branco”, ou seja, não houve incubação com os antissoros para que o sinal inespecífico do anticorpo secundário ao antígeno fosse descontado de cada reação.

Em seguida, adicionaram-se 50 µL das amostras adsorvidas por poço da placa na qual as proteínas recombinantes foram imobilizadas e foi feita incubação a 37 °C por 1 hora. A placa foi lavada e incubada por 1 hora com 50 µL por poço de anti-IgG ou anti-IgA de camundongo conjugado com peroxidase na diluição 1:5.000, ou anti-IgM de camundongo (Sigma) na diluição de 1:5.000, em PBS, seguido de incubação com anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição de 1:50.000. A reação enzimática foi revelada pela adição de 100 µL de uma solução contendo 1 mg/mL de OPD (δ -phenylenediamina, Sigma) diluído em tampão fosfato-citrato pH 5 contendo 1 µL/mL de peróxido de hidrogênio. Após 10 minutos de incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de solução de H₂SO₄ 4N. A intensidade da reação foi analisada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492 nm. O título individual foi determinado como sendo o inverso da maior diluição do soro com valor da DO₄₉₂ nm maior do que 0,1.

Adicionalmente, foi realizada uma isotipagem e determinação quantitativa dos anticorpos IgG nos soros de camundongo. IgG total, IgG1 e IgG2a foram determinados por incubação do *pool* dos soros com as proteínas recombinantes (250 ng/poço), seguida por incubação com anti-IgG de camundongo (Sigma), para determinação de IgG total, ou anti-

IgG1 e anti-IgG2a de camundongo (Southern Biotech, Alabama, EUA), ambos 1:2.000, seguida por incubação com anti-cabra IgG (Sigma), na diluição de 1:20.000. Paralelamente, IgG total, IgG1 e IgG2a de camundongo (Southern Biotech) foram diluídos em diferentes concentrações e imobilizados em placa de ELISA a fim de se gerar curvas padrões, com as quais os valores de DO492 nm apresentados pelas incubações dos soros foram comparados.

3.18 Avaliação da resposta celular e avaliação de citocinas

Ao final dos protocolos de imunização, camundongos BALB/c imunizados com as proteínas recombinantes e PBS (controle negativo) foram sacrificados em CO₂ e seus baços foram assepticamente removidos e depositados em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium-RPMI-1640, contendo 2 mM L-glutamina, 100 IU/mL of Penicilina, 100 µg/mL de Streptomina e 50 µg/mL of Gentamicina). Os baços foram macerados com auxílio de um *porter* e centrifugados por 10 minutos a 1.100 rpm, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e à fase sedimentada foi adicionado 1 mL de água gelada estéril, para lise dos eritrócitos; após este procedimento, as suspensões foram novamente centrifugadas.

O sobrenadante resultante foi descartado e os esplenócitos foram ressuspensos em 1 mL de RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram contadas após marcação com 0.4% azul de tripano e então distribuídas em triplicada em uma placa de cultura celular de 96 poços (Costar, Corning), na quantidade de 5×10^5 células/poço.

Os esplenócitos foram tratados com 5 µg/mL do mitógeno Concanavalina A (ConA) (Sigma), empregado como controle positivo de proliferação, 5 µg/mL de cada proteína recombinante ou foram destituídos de estímulo (apenas meio), sendo este tratamento empregado como controle negativo de proliferação. Foi feita a cultura destas células por 48 horas a 37 °C e 5% CO₂, em atmosfera umidificada, e a taxa de proliferação celular foi determinada em função da replicação do DNA, medida pela incorporação de bromodesoxiuridina (BrdU), um análogo de base nitrogenada timina, por um kit de ELISA colorimétrico-BrdU (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN).

As células foram incubadas por 2h com BrdU para permitir a marcação do DNA genômico. Em seguida, anticorpo anti-BrdU conjugado com peroxidase (1:100) foi adicionado e as células incubadas por 90 minutos. Solução de substrato para a enzima foi adicionada e foi feita incubação à temperatura ambiente por 15 minutos; a reação enzimática foi parada pela adição de H₂SO₄ 1M e a densidade ótica foi medida a 450 nm.

O Índice de Estimulação (I.E) foi calculado como sendo o quociente entre a DO450 nm média das células estimuladas com a proteína recombinante e a DO450 nm média das células cultivadas apenas em meio, ou seja, sem estímulo, dentro do grupo dos animais imunizados.

Para análise estatística, primeiramente foi avaliada a diferença entre as médias do tratamento no qual as células foram estimuladas com a proteína, entre o grupo imunizado e grupo PBS (controle negativo). Sendo detectada diferença significativa, a análise estatística foi então feita dentro do grupo dos animais imunizados entre o tratamento com proteína e apenas meio, pelo teste t-Student. Um p-valor menor do que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3.19 Avaliação de citocinas

Para análise das citocinas secretadas, as células do baço foram extraídas segundo protocolo acima descrito. A cultura dos esplenócitos foi feita em placa de cultura celular de 24 poços, cada qual contendo 5×10^6 células, em triplicata. Após 48 horas de cultura, a placa foi centrifugada e o sobrenadante resultante da cultura celular foi coletado e armazenado em curto prazo a -20°C . As citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF- α foram medidas por ELISA sanduiche (PreproTech, Colonia Narvarte, México), de acordo com as instruções do fabricante. Em suma, o anticorpo de captura foi imobilizado à placa de ELISA durante cerca de 16 horas, a placa foi lavada e bloqueada com solução de bloqueio por 1 hora.

Os padrões de citocinas foram diluídos para compor uma curva de concentração. Então, 100 μL de cada sobrenadante foram adicionados a cada poço, e a placa foi incubada por 2 horas a 37°C . Foi adicionado o anticorpo de detecção (1:2.000), seguido por 2 horas de incubação; o substrato foi adicionado a cada poço e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. As leituras colorimétricas foram feitas no comprimento de onda de 405 nm, e os valores de absorbância foram convertidos em valores de concentração mediante comparação com a curva de concentrações gerada.

Para análise estatística, primeiramente foi avaliada a diferença entre as médias do tratamento no qual as células foram estimuladas com a proteína, entre o grupo imunizado e grupo PBS (controle negativo). Sendo detectada diferença significativa, a análise estatística foi então feita dentro do grupo dos animais imunizados entre o tratamento com proteína e apenas meio, pelo teste t-Student. Um p-valor menor do que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3.20 Detecção de anticorpos IgG em soros de pacientes diagnosticados com leptospirose e soro de hamsters experimentalmente infectados.

A detecção de anticorpos IgG anti-OmpL1, anti-rLIC10731 e anti-rLIC10645 foi realizada de maneira semelhante aos experimentos de detecção de anticorpos em soro de camundongos imunizados. As placas foram imobilizadas com os antígenos de interesse, neste caso as proteínas recombinantes, compondo uma massa de 250 ng de proteína por poço. Os soros humanos e de hamsters foram empregados na diluição de 1:100 e os mesmos foram adsorvidos por 1 hora em extrato de *E. coli* 10% (v/v). O anticorpo secundário, anti-IgG humano conjugado com peroxidase ou anti-IgG de hamster (Sigma) conjugado com peroxidase, foi empregado na diluição de 1:3.000 e a revelação das placas foi feita da mesma maneira acima descrita. Para a determinação da frequência de pacientes positivos para a presença de anticorpos, foi utilizado como limiar o valor de corte (*cutoff value*), o qual foi baseado na densidade ótica de 8 soros de indivíduos normais ou 5 hamsters não infectados, sendo calculado como a média dos valores de absorvância apresentados pelos indivíduos somada a 3 vezes o desvio padrão.

A reatividade de cada soro foi realizada em duplicata, e os valores finais expressos correspondem à média dos valores de densidade ótica.

3.21 Cálculo da especificidade da reação de detecção de IgG humano anti-OmpL1

Devido aos sintomas clínicos pouco específicos da leptospirose, a reatividade da proteína OmpL1 com amostras de soros de pacientes diagnosticados com doenças infecciosas não-relacionadas, e que não apresentaram histórico de leptospirose, foi avaliada.

A especificidade da reação foi avaliada por meio da reação com soros de pacientes com dengue (n=13), malária (n=12), HIV (n=15) e doença de Chagas (n=20). Os soros foram utilizados na diluição de 1:100 e os valores de especificidade foram calculados pelo método de Galen e Gambino (1975).

3.22 Preparo dos extratos proteicos de *Leptospira* spp.

Culturas de leptospiros previamente mencionadas foram crescidas por uma semana e então centrifugadas a 4 °C por 20 minutos, a 5.000 rpm. O sobrenadante resultante foi

descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com 5 mL de PBS low-salt (contendo 50 mM NaCl). O sedimento resultante ao final das lavagens foi ressuspensionado em 200 μ L de PBS, sendo esta alíquota empregada como extrato proteico total de *Leptospira* spp..

3.23 Immunoblotting

As proteínas ou extratos a serem avaliados foram separadas por SDS-PAGE 12% e transferidos para membrana de nitrocelulose “Hybond-ECL” (GE Healthcare) em sistema semi-úmido (GE) por 1 hora a 0,8 mA por cm^2 em Tris-Glicina acrescido de 1,85% de SDS (tampão de transferência). A eficiência da transferência foi avaliada por coloração de *Ponceau S* (Sigma). A membrana foi então lavada e incubada com solução de bloqueio (PBS-T-leite desnatado 10%) durante uma noite a temperatura de 4 °C. Lavou-se a membrana e logo após a mesma foi incubada com anticorpo primário e secundário, dependendo do experimento. Lavou-se novamente a membrana por 15 minutos com PBS-T, e a reatividade foi detectada utilizando-se o kit *ECL Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare). Filmes de raio-X (Kodak) foram expostos à membrana por tempos curtos (1 a 10 minutos) e em seguida revelados. A quimiluminescência da reação da peroxidase também foi detectada com auxílio do software *Carestream Molecular Imaging* (Carestream Health, Inc.) acoplado ao aparelho Gel Logic 2200PRO.

3.24 Avaliação da localização celular das proteínas nativas

3.24.1 Imunofluorescência

Foi coletado volume de uma cultura incubada por cerca de 10 dias de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 suficiente para conter 10^9 células por tratamento, sendo então centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos. O *pellet* resultante foi lavado 2 vezes com PBS low-salt. A concentração das bactérias na cultura foi determinada por meio 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 o seguinte cálculo foi empregado:

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

As leptospiros então foram incubadas com 200 µL de solução de paraformaldeído 2%, por 40 minutos a 30 °C, e após esse período, a solução foi centrifugada a 5.000 rpm por 20 minutos e o *pellet* resultante foi ressuspensionado em solução de BSA 3% contendo antissoro gerado contra LipL32 (proteína sabidamente de membrana externa), DnaK (proteína citoplasmática) ou contra as proteínas recombinantes na diluição de 1:50. Cabe ressaltar que o antissoro anti-LipL32 e anti-Dnak foram gerados por meio de imunização de animais com as respectivas proteínas recombinantes.

As leptospiros foram incubadas por 1 h a 30 °C com a solução contendo antissoro e foram então centrifugadas (5.000 rpm por 20 minutos) e o *pellet* resultante foi lavado três vezes com PBS low-salt. Por fim, as leptospiros foram incubadas com solução de BSA 3% contendo iodeto de propídio (Sigma) na diluição de 1:20 e anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (Sigma), na diluição de 1:50, por 45 minutos a 30 °C. Após esse período, a solução foi centrifugada e o *pellet* resultante foi lavado duas vezes com PBS low-salt.

As imagens foram captadas em microscópio de imunofluorescência confocal LSM 510 META (Carl Zeiss Inc., Alemanha), alocado no Departamento de Parasitologia do Instituto Butantan (São Paulo, SP). Foi utilizado aumento de 600X (FITC, excitação 488 nm, emissão 500-550 nm; Iodeto de propídio, excitação 543 nm, emissão 612-619 nm).

3.24.2 Acessibilidade por proteinase K

A digestão enzimática das proteínas localizadas na superfície de *L. interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 foi feita seguindo protocolo descrito por Pinne e Haake (2009), com algumas modificações. As leptospiros foram crescidas por cerca de uma semana e então contadas, centrifugadas (5.000 rpm por 20 minutos) e ressuspensionadas em tampão de proteólise, contendo 10 mM Tris-HCl pH 8 e 5 mM CaCl₂, compondo um total de 10⁸ leptospiros/mL por tratamento.

Os tratamentos empregados foram distintos tempos de contato com proteinase K (PK, Sigma), na concentração de 25 µg/mL. Assim sendo, as bactérias foram incubadas a 37 °C, sob baixa agitação, durante 0 horas (ausência de degradação das proteínas de superfície), 30 minutos, 1 hora, 3 horas e finalmente 5 horas. Quando os períodos de incubação foram atingidos, a atividade da PK foi cessada por meio da adição de 2 mM de PMSF, um inibidor de serino-protease, e as bactérias centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS-low salt e ressuspensionadas em 1 mL de PBS-low salt; esta solução final foi utilizada para imobilização

das leptospiras em placas de ELISA (50 μ L/poço). As placas de ELISA foram bloqueadas com PBS-low salt contendo 3% BSA, e a detecção das proteínas foi feita por meio da adição de antissoro gerado contra as proteínas recombinantes, na diluição de 1:200 em PBS-low salt 3% BSA. Como controle, foram empregados antissoro contra LipL32 (controle positivo de degradação, 1:1.000) e contra DnaK (controle negativo de degradação, 1:3.000).

Para as análises estatísticas, as absorvâncias nos diferentes tempos de incubação com PK foram comparadas com as absorvâncias no tempo 0 horas, que contém o máximo sinal, pelo teste t-Student. Um p-valor menor do que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3.25 Ensaio de adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular e soro

Os componentes previamente descritos foram diluído em PBS (10 μ g/mL) e a cada poço de uma placa de ELISA foi adicionado 1 μ g dos mesmos, os quais foram incubados por 3 horas a 37 °C para imobilização. Após esse período, as placas foram lavadas, e então foram bloqueadas com PBS-T acrescido de 10% leite desnatado; as placas foram incubadas a 4 °C por 16 horas. A solução de bloqueio foi descartada, as placas lavadas e a cada poço foi adicionado 1 μ g de cada proteína recombinante em 100 μ L de PBS. A interação entre componente e proteína foi estendida por 2 horas a 37 °C, e então as placas foram lavadas seis vezes e a detecção das proteínas recombinantes ligadas foi feita pela adição de *pool* de soro policlonal específico para cada proteína teste, empregado em uma diluição que apresentou OD492 nm igual a 1 nos experimentos de titulação, em 100 μ L de PBS. As placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C, então novamente lavadas, e foram adicionados 100 μ L por poço do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, na diluição de 1:5.000, e a incubação procedeu-se por 1 hora a 37 °C. A reação foi revelado com substrato OPD conforme mencionado anteriormente.

Para confirmação da ligação, o mesmo experimento foi feito e a reatividade foi acessada por meio da utilização do anticorpo monoclonal anti-His conjugado com peroxidase, utilizado na diluição que apresentou OD492 nm igual a 1 em experimentos de titulação.

Para as análises estatísticas, a média dos valores de absorvância de cada componente foi comparada com as médias apresentadas pelos controles negativos, pelo teste t-Student, e o um p-valor abaixo de 0,05 (5%) foi considerado estatisticamente significativo. O p-valor apresentado nos resultados se refere ao controle negativo gelatina.

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

Para aqueles componentes aos quais foi verificada interação significativa com as proteínas recombinantes, foi realizada uma curva de dose-resposta, a fim de se caracterizar a ligação. Para tal, cada componente foi imobilizado nas placas de ELISA (ou gelatina, como controle negativo) e então estas foram bloqueadas; foram adicionadas concentrações crescentes de cada proteína recombinante, diluídas em PBS. A detecção da ligação foi realizada conforme acima mencionado.

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

Quando a saturação de ligação não foi atingida, a constante de dissociação foi estimada por regressão linear baseando-se em uma cinética enzimática de Michaelis-Menten, da qual parte a fórmula utilizada por Lin et al. (2009).

A equação para regressão utilizada foi a seguinte:

$$1/A = (K_D/A_{\max}) \cdot 1/[\text{proteína}] + 1/A_{\max}$$

3.27 Ensaio de inibição da ligação pela incubação com antissoro anti-proteína recombinante

Foi verificado o efeito dos anticorpos contra cada proteína recombinante na ligação dessas aos componentes da matriz extracelular e soro, de uma maneira dose-dependente. Os componentes foram imobilizados em placas de ELISA e estas então foram bloqueadas. Cada proteína recombinante (1 μg) foi incubado com o antissoro anti-proteína recombinante ou soro pré-imune em diferentes diluições (1:50 até 1:400, por 2 horas a 37 °C). O soro pré-imune foi empregado como controle negativo de bloqueio da ligação. A detecção da ligação das recombinantes foi realizada como acima descrito.

Para as análises estatísticas, primeiramente foi detectada diferença significativa entre os distintos grupos (incubação com antissoro ou soro pré-imune) para cada tratamento

(concentração); em seguida a média dos valores de absorbância de cada tratamento foi comparada à média da situação sem incubação com antissoro, pelo teste t-Student, e um p-valor abaixo de 0,05 (5%) foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados foram expressos em porcentagem de ligação.

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

Foi verificado o efeito da desnaturação das proteínas recombinantes na ligação dessas aos componentes da matriz extracelular e soro. Os componentes foram imobilizados nas placas, e estas foram bloqueadas. Então, cada proteína recombinante foi diluída (10 µg/mL) e fervida a 100 °C por 10 minutos, para que ocorresse a desnaturação, e então transferidas para as placas de ELISA às quais os componentes foram previamente imobilizados. A detecção da ligação foi feita conforme acima descrito.

Para as análises estatísticas, a média dos valores de absorbância obtidos pela ligação das proteínas desnaturadas aos componentes foi comparada com a média dos valores de absorbância obtidos pela ligação das proteínas não desnaturadas, pelo teste t-Student, e um p-valor abaixo de 0,05 (5%) foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados foram expressos em porcentagem de ligação.

3.29 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio

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

Para as análises estatísticas, a média dos valores de absorbância obtidos pela ligação das proteínas incubadas com ACA foi comparada com a média dos valores de absorbância obtidos pela ligação das proteínas na situação onde não havia o competidor (máximo de ligação), pelo teste t-Student, e um p-valor abaixo de 0,05 (5%) foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados foram expressos em porcentagem de ligação.

3.30 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes à laminina

Laminina foi diluída em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5) na concentração final de 10 µg/ml e então adicionada à placa de ELISA para imobilização, conforme acima descrito. Após, a laminina imobilizada foi tratada com diferentes concentrações de metaperiodato de sódio (0-100 mM) (Sigma), para que ocorresse a oxidação dos resíduos de açúcares na macromolécula. Em seguida, as proteínas recombinantes foram adicionadas aos poços (1 µg/poço) e a detecção da ligação foi feita conforme acima mencionado.

Para as análises estatísticas, a média dos valores de absorbância obtidos pela ligação das proteínas à laminina oxidada foi comparada com a média dos valores de absorbância obtidos pela ligação das proteínas à laminina sem oxidação, pelo teste t-Student, e um p-valor abaixo de 0,05 (5%) foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados foram expressos em porcentagem de ligação.

3.31 Ensaio de atividade enzimática da plasmina

Este experimento foi feito para verificar se o plasminogênio ligado às proteínas recombinantes consegue ser convertido à sua forma enzimaticamente ativa, a plasmina.

Para tanto, o procedimento foi realizado conforme proposto por Vieira et al. (2009). Em suma, as placas de ELISA foram incubadas com 1 µg de cada proteína recombinante ou BSA (empregado como controle negativo) por poço, em triplicata, lavadas 3 vezes com PBS-T e bloqueadas com PBS-T 10% leite desnatado, por 2 horas a 37 °C. Em seguida, foi adicionado 1 µg de plasminogênio por poço, e este foi deixado interagir com as proteínas imobilizadas por 2 horas a 37 °C. As placas foram lavadas e a cada poço foram adicionados 4 ng de ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA-Sigma) e substrato cromogênico para plasmina, D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride (Sigma), na concentração de 0,4 mM e volume final de 100 µL, em PBS. Foram incluídos controles nos quais um dos componentes foi omitido (Plasminogênio, uPA ou substrato).

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

Para as análises estatísticas, primeiramente os valores de absorbância do tratamento completo foi comparado com os valores de absorbância dos tratamentos controles (nos quais um dos componentes foi omitido), e sendo detectada diferença significativa, os valores de

absorbância foram comparados com o controle negativo BSA, pelo teste t-Student, e um p-valor abaixo de 0,05 (5%) foi considerado estatisticamente significativo.

3.32 Inibição do coágulo de fibrina

A proteína recombinante OmpL1 (3 μ M) foi incubada com fibrinogênio (1 mg/mL) por 2 horas a 37 °C. Foram colocados 90 μ L da solução de fibrinogênio mais proteína recombinante em cada poço de uma placa de ELISA, bem como 10 μ L de uma solução 10 U/mL de trombina (Sigma), para iniciar a formação do coágulo de fibrina. A reação foi prolongada por 45 minutos e foram empregados um controle negativo, no qual a trombina foi omitida da reação, e um controle positivo, no qual não houve incubação do fibrinogênio com a proteína recombinante, ou seja, uma situação onde o coágulo se forma livre de interferência. A formação do coágulo de fibrina foi medida por meio da leitura da turbidez no comprimento de onda de 600 nm. Os resultados são expressos em porcentagem de coágulo, sendo a turbidez do coágulo no tratamento sem incubação com recombinante, ao final da cinética, considerada 100%.

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

3.33 Interferência entre os componentes na ligação às proteínas recombinantes

Para elucidar se uma proteína recombinante se liga a seus componentes por meio de sítios distintos, foi feito um ensaio de interferência. As placas foram imobilizadas com 1 μ g da proteína recombinante por poço e bloqueadas. A cada poço, foi adicionado uma massa fixa de um dos componentes (1 μ g) juntamente com massas crescentes do componente com o qual se deseja verificar interferência (0.1-1 μ g), em 100 μ L de PBS. Os componentes foram deixados interagir por 2 horas a 37 °C com a proteína recombinante imobilizada e a detecção da ligação foi feita com o uso de anticorpos que reconhecem especificamente os componentes, os quais foram previamente titulados e empregados em uma diluição que fornece uma OD_{492nm} igual a 1.

As reações foram reveladas por meio do substrato OPD, conforme descrito, e as análises estatísticas foram feitas comparando-se os valores de absorbância obtidos nas incubações com diferentes massas do competidor em relação aos valores obtidos na situação

na qual foi omitido o componente competidor, pelo teste t-Student. Um p-valor abaixo de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3.34 Inibição da ligação das leptospiros vivas ao componente

Para verificar se as proteínas recombinantes ligadas aos componentes são capazes de reduzir a interação destes com as leptospiros, o seguinte experimento foi realizado: 1 µg de cada componente foi imobilizado por poço de uma placa de ELISA, a qual foi bloqueada com PBS-T 10% leite. Então, aos poços foram adicionadas concentrações crescentes das proteínas recombinantes. Após incubação por 2 horas a 37 °C, as placas foram novamente lavadas e incubadas com 100 µL de uma solução 10⁸ leptospiros/mL, as quais foram incubadas por 2 horas a 37 °C. Após lavagem, a detecção das leptospiros ligadas foi feita por meio da incubação com antissoro anti-LipL32 (1:2.000), pelo fato da proteína LipL32 ser o antígeno majoritário da membrana externa de *Leptospira* spp. (HAAKE et al., 2000); em seguida adicionou-se anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5.000) e a reação foi revelada conforme acima descrito.

Para as análises estatísticas, os valores de absorbância obtidos nas situações onde o componente foi incubado com a proteína recombinante foram comparados à situação na qual não houve incubação, ou seja, o máximo de ligação das leptospiros ao componente, pelo teste t-Student, e um p-valor menor do que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os valores são expressos em porcentagem de ligação.

3.35 Preparo de bacterina para ensaios de imunoproteção

A bacterina foi preparada conforme descrito por Silva et al. (2007). Foi determinada a densidade celular de cultura de *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm virulenta recém isolada de animal infectado. Após a contagem, a dose do inóculo foi ajustada para 10⁹ leptospiros/animal. A cultura foi centrifugada durante 20 minutos a 5.000 rpm, à temperatura ambiente, e o sedimento foi lavado duas vezes com tampão PBS low-salt. O sedimento foi ressuspenso em PBS e incubado por 20 minutos a 56 °C para inativação das bactérias, e as alíquotas foram armazenadas a -20 °C. Para confirmar a inativação completa das bactérias, 1 mL de bacterina foi inoculado em meio EMJH para se verificar a ausência de crescimento.

3.36 Ensaio de imunoproteção

Os ensaios de imunoproteção foram realizados no laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da USP. Grupos de doze hamsters sírios machos recém-desmamados (80 a 120 gramas) foram imunizados pela via subcutânea no dorso com 50 µg de proteína recombinante, dose de bacterina (controle positivo) ou PBS (controle negativo) em suspensão contendo *Aldydrogel* (2% Al(OH)₃, Brenntag Biosector) na concentração final de 12% como adjuvante. Os animais receberam comida e água *ad libitum*.

Foram realizadas duas imunizações no intervalo de duas semanas e a cada imunização os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital. Os soros foram avaliados por ELISA, semelhante ao descrito para o soro hiper-imune produzido em camundongo. O soro dos animais foi diluído em placa de microdiluição, adsorvido com extrato de *E. coli* e então transferido para placas de ELISA contendo a proteína recombinante previamente imobilizada (250 ng/poço). Após incubação, as placas foram lavadas e a elas foram adicionados 50 µL de anti-IgG de hamster conjugado com peroxidase (1:5.000, diluído em PBS). A reação foi revelada com substrato OPD como descrito anteriormente.

Dois semanas após a segunda imunização, os animais foram infectados por inoculação intraperitoneal de 200 µL de cultura de *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm virulenta recém-isolada, sendo inoculadas $2,5 \times 10^3$ leptospiiras/animal. Para cálculo da DL₅₀, as bactérias foram contadas em câmara de Petroff-Hausser e então inoculadas em hamster em diluições seriadas de 10 vezes, iniciando em 10⁹ até 10⁰ leptospiiras/animal. Para cada diluição utilizada, 4 animais foram inoculados. A DL₅₀ corresponde à diluição na qual houve 50% de morte dos animais. Os animais inoculados foram observados quanto ao aparecimento dos sintomas de leptospirose por 21 dias, e ao final deste período os sobreviventes foram sacrificados. O sangue foi coletado via punção cardíaca e o soro foi avaliado quanto à presença de anticorpos. O rim dos animais sobreviventes foram coletados, macerados, ressuspendido em solução salina (na diluição de 1:10 e 1:100) e cultivados em meio EMJH modificado semi-sólido a 28 °C para avaliação da presença de leptospiiras após 6 semanas de observação.

A análise de significância estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism versão 3.0, utilizando o método Kaplan-Meier (KAPLAN; MEIER, 1958). O p-valor abaixo ou igual a 5% foi considerado estatisticamente significativo.

3.37 Teste de Microaglutinação (MAT)

O ensaio de MAT é rotineiramente realizado no Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, conforme descrito por 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, Grippytyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Shermani, Tarassovi, Hardjo (hardjoprajitno), Hardjo (hardjobovis) e Wolffi. Todas as linhagens são mantidas em meio EMJH modificado a 28 °C. Um teste é considerado positivo quando há um aumento de pelo menos quatro vezes na microaglutinação de amostras de soros pareados. O sorovar que apresentar um título de aglutinação de 50% na maior diluição é considerado o provável sorotipo predominantes. O teste é considerado negativo se não houver aglutinação com nenhum dos sorovares listados acima.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de bioinformática dos genes selecionados

O estudo de proteínas de membrana de *Leptospira* spp. é importante porque estas estão em contato com o hospedeiro e contribuem para a sobrevivência no meio ambiente. Inclusive, algumas proteínas de membrana externa são reguladas de forma diferenciada nas condições *in vivo* e *in vitro* (LO et al., 2006; MATSUNAGA et al., 2007).

Neste trabalho foram selecionados 3 genes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Segundo o software LipoP, todas os genes selecionados codificam para proteínas que possivelmente serão destinadas à membrana de *Leptospira*. A proteína OmpL1, codificada pelo gene LIC10973, possui sinal SpI, portanto não é uma lipoproteína, embora seja encaminhada para a membrana externa (HAAKE et al., 1993). Já as proteínas relativas aos genes LIC10731 e LIC10645 possuem sinal SpII, tratando-se portanto de possíveis lipoproteínas, pois essa região é reconhecida pela enzima peptidase sinal II, a qual é responsável pela clivagem do peptídeo sinal e por lipidação de resíduos de cisteína.

Adicionalmente, o software PSORT e CELLO foram utilizados para definir a localização celular possível das proteínas, utilizando-se de algoritmo funcional para bactérias gram-negativas. De acordo com os resultados, as proteínas OmpL1 e a proteína codificada pelo gene LIC10645 possuem alta probabilidade de estarem alocadas na membrana externa da bactéria, ao passo que a proteína codificada pelo gene LIC10731 apresentou resultados distintos pelos dois softwares, uma vez que foi dada como proteína de membrana citoplasmática ou de espaço periplasmático pelo PSORT e como de membrana externa pelo CELLO.

A proteína codificada pelo gene LIC10731 é uma provável lipoproteína, e como se sabe, a grande maioria das lipoproteínas em *Leptospira* spp., assim como em *Borrelia* spp., se localiza na membrana externa (HAAKE et al., 2000). Esta proteína também possui um resíduo de aminoácido neutro após a cisteína N-terminal, outro forte indício de localização na membrana externa da bactéria (MATSUNAGA et al., 2006).

Atualmente, três espécies de *Leptospira* spp. possuem genoma completo sequenciado: *L. interrogans* sorovar Lai (REN et al., 2003) e sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004a), *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis (BULACH et al., 2006) e *L. biflexa* sorovar Patoc (PICARDEAU et al., 2008).

Por meio da análise comparativa das sequências de aminoácidos (blastp) preditas verificou-se que as três proteínas possuem similaridade com uma proteína predita em *L. interrogans* sorovar Lai, em *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis, e apenas OmpL1 possui similaridade com uma proteína predita na espécie saprofítica *L. biflexa*, embora baixa.

A proteína OmpL1 possui um domínio estrutural do tipo Porin_OmpL1, que denota um domínio do tipo porina, presente entre os aminoácidos 45 e 311, de acordo com o programa PFAM. A proteína codificada pelo gene LIC10731, segundo definido pelo PFAM e SMART, possui um domínio da família Beta-lactamase entre os aminoácidos 86 e 366. Segundo o resultado, esse domínio catalisa a abertura e quebra do anel beta-lactâmico contido em antibióticos beta-lactâmicos, como penicilina, por exemplo; essas beta-lactamases normalmente são secretadas. A proteína codificada pelo gene LIC10645 possui apenas algumas regiões de baixa complexidade e não possui nenhum domínio conservado.

O modelo topológico predito da proteína OmpL1 é composto por 10 domínios anfipáticos de folha- β (HAAKE et al., 1993; SHANG et al., 1995). Pela análise utilizando o software TMBETA, a proteína codificada pelo gene LIC10731 possui 15 domínios transmembrana do tipo folha- β e a proteína codificada pelo gene LIC10645 possui 14.

Quanto à predição de domínios transmembrana do tipo alfa-hélice, feita pelo software TMHMM, a proteína codificada pelo gene LIC10731 possui apenas um domínio deste tipo, porém localizado no peptídeo sinal; o mesmo foi observado para a proteína codificada pelo gene LIC10645.

O Quadro 3 mostra resumidamente a análise por bioinformática das proteínas codificadas pelos genes selecionados para o estudo.

A proteína OmpL1, pela análise da sequência de aminoácidos, se mostrou bastante conservada entre diferentes espécies e sorovares de *Leptospira*, que, embora não tenham sido inteiramente sequenciados, possuem algumas sequências depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information). A similaridade da sequência de aminoácidos desta proteína em *L. interrogans* sorovar Copenhageni é bastante alta em relação a diversas espécies patogênicas de leptospira, como *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. weilii* e *L. santarosai*.

Em relação à proteína codificada pelo gene LIC10731, sua sequência de aminoácidos apresenta similaridade com sequência de *L. weilii*, *L. noguchii* e *L. santarosai* acima de 80%. Similaridade no domínio de beta-lactamase também foi observada em relação a proteínas de outros gêneros de bactérias, como *Paenibacillus*, *Collimonas* e *Burkholderia*. Quanto à

proteína codificada pelo gene LIC10645, similaridade de 81% foi observada em *L. noguchii*, e em menor porcentagem em *L. santarosai* e *L. weilii* (44% e 50%, respectivamente).

Quadro 3 - Resumo das análises por bioinformática

Gene ID	Descrição	Sítio de Clivagem	Domínio conservado	Similaridade com outras espécies já sequenciadas
LIC10973 (OmpL1)	Proteína de membrana predita	24-25	Porin_OmpL1	Lai 94% Hardjo-bovis 87% <i>L. biflexa</i> : 44%
LIC10731	Lipoproteína predita	35-36	Beta-lactamase	Lai 100% Hardjo-bovis 85% <i>L. biflexa</i> : ausente
LIC10645	Lipoproteína predita	25-26	-	Lai 99% Hardjo-bovis 52% <i>L. biflexa</i> : ausente

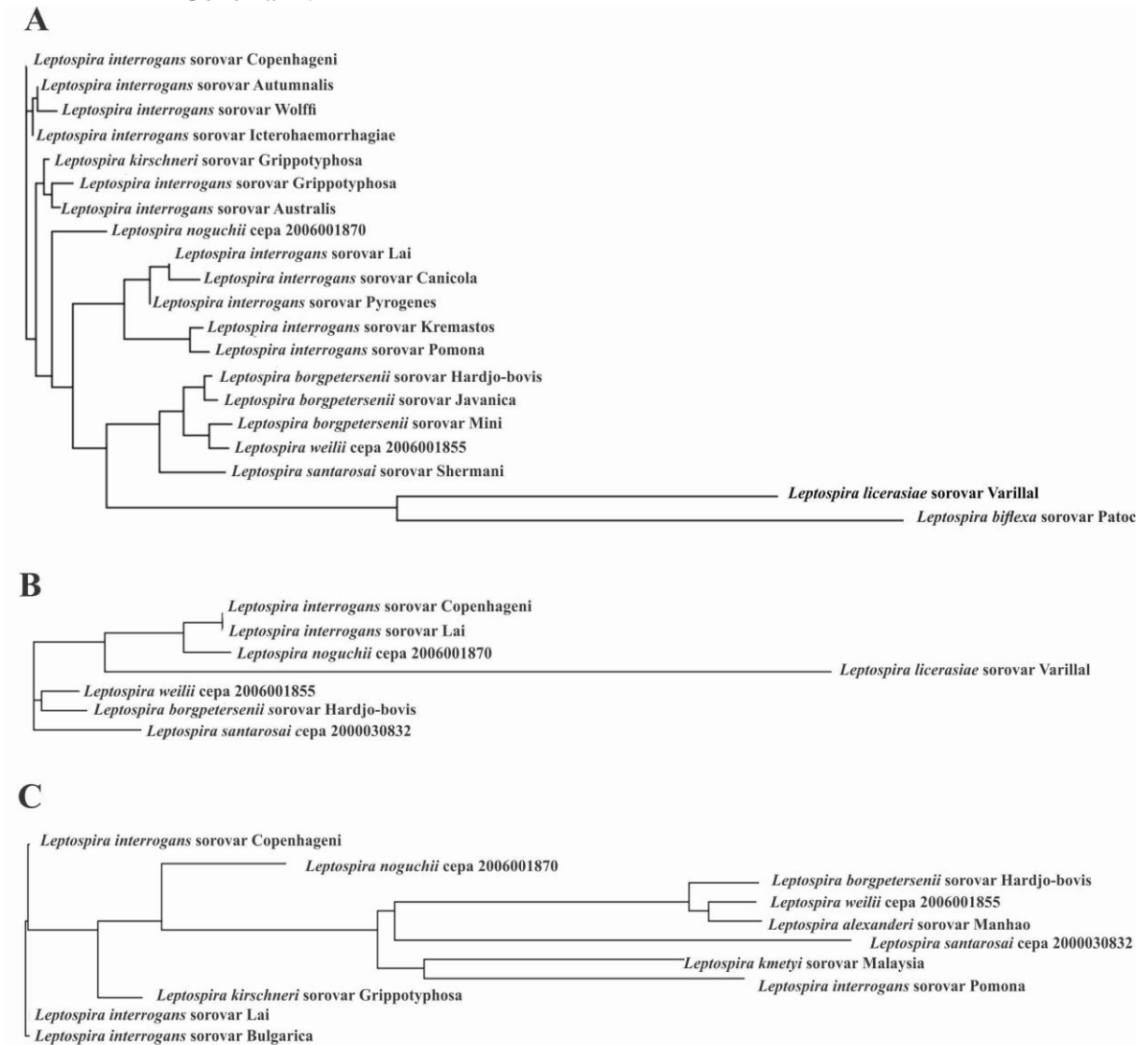
Notas: Gene ID: identificação do gene no genoma *L. interrogans* sorovar Copenhageni; Abreviaturas: Lai: *L. interrogans* sorovar Lai; Hardjo-bovis: *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis; *L. biflexa*: *L. biflexa* sorovar Patoc.

Foi gerado um filograma utilizando as sequências de aminoácidos disponíveis no GeneBank, e o resultado pode ser visualizado na Figura 4. Pela análise do filograma, a proteína codificada pelo gene OmpL1 se mostrou presente em várias cepas, tanto patogênicas quanto saprofíticas e intermediárias. Existe uma clara similaridade/proximidade entre as sequências presentes nas cepas patogênicas e baixa similaridade com sequências contidas nas cepas saprofítica e intermediária, as quais estão organizadas em um ramo mais distante.

A proteína codificada pelo gene LIC10731 mostrou maior similaridade entre as cepas patogênicas, sendo a cepa intermediária disposta em um ramo mais distante. A proteína codificada pelo gene LIC10645 mostrou uma distribuição dispersa no filograma, entre as cepas patogênicas, sugerindo uma conservação moderada. Adicionalmente, uma cepa saprofítica (*L. kmetyi*) foi agrupada com uma cepa patogênica (*L. interrogans*).

Cabe ressaltar que, embora o filograma tenha sido gerado com base na sequência de aminoácidos codificados pelos genes, isso não implica em a proteína ser expressa nas diferentes cepas. Estas sequências de aminoácidos são geradas por tradução conceitual de sequências de nucleotídeos depositadas no NCBI.

Figura 4 - Filograma gerado a partir das seqüências de aminoácidos disponíveis no GeneBank.



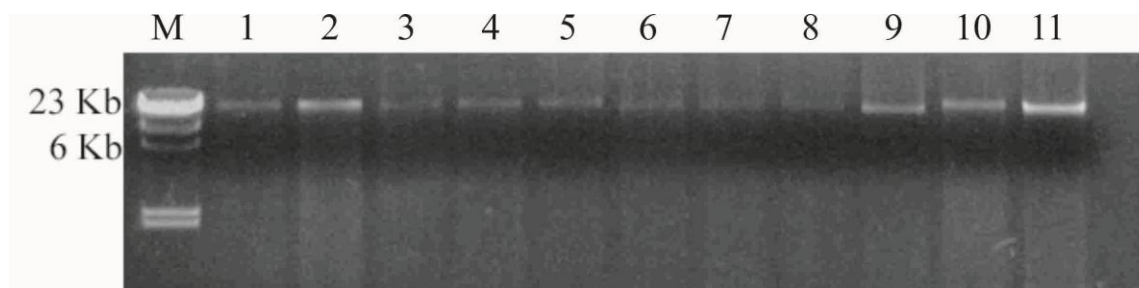
Um filograma foi gerado utilizando as seqüências de aminoácidos disponíveis no GeneBank, as quais são geradas por tradução conceitual de seqüências de nucleotídeos. (A) refere-se ao gene OmpL1, (B) ao gene LIC10731 e (C) ao gene LIC10645.

4.2 Análise da presença dos genes e respectivos transcritos entre os diversos sorovares de *Leptospira*

Devido à grande variedade da composição antigênica entre os diversos sorovares de *Leptospira* (LEVETT, 2001), a análise da presença dos genes em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* é um fator importante a ser avaliado quando se trata de um antígeno em potencial. Para tal, foi realizada uma extração de DNA genômico de *Leptospira* spp. e estudo da presença dos genes OmpL1, LIC10731 e LIC10645 por meio da técnica de PCR.

O resultado da extração de DNA das cepas anteriormente mencionadas pode ser visualizado na Figura 5. As concentrações de DNA obtidas foram quantificadas e ajustadas a uma concentração padrão, para realização das reações de amplificação.

Figura 5 - Visualização da extração do DNA genômico de diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* em gel de agarose (1%).



DNA genômico das espécies patogênicas *L. interrogans* sorovares: Copenhageni (1), Canicola (2), Icterohaemorrhagiae (3) Pomona (4), *L. borgpetersenii* sorovares: Castellonisi (5), Whitcombi (6), *L. kirshneri* sorovares Cynoptery (7) e Grippotyphosa (8), *L. santarosai* sorovar Shermani (9), *L. noguchii* sorovar Panama (10), e da espécie saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc (11). M: marcador Lambda HindIII.

Pela análise de amplificação do DNA genômico (Figura 6), pode-se constatar que o gene OmpL1 foi detectado em todas as espécies e sorovares patogênicos testados, estando ausente em *L. biflexa*, o que é pertinente, visto que o gene está presente em todas as cepas patogênicas (HAAKE et al., 1993; HAAKE et al., 1999; HAAKE et al., 2004; ZUERNER et al., 2000), embora exista uma sequência com baixa similaridade na cepa saprofítica.

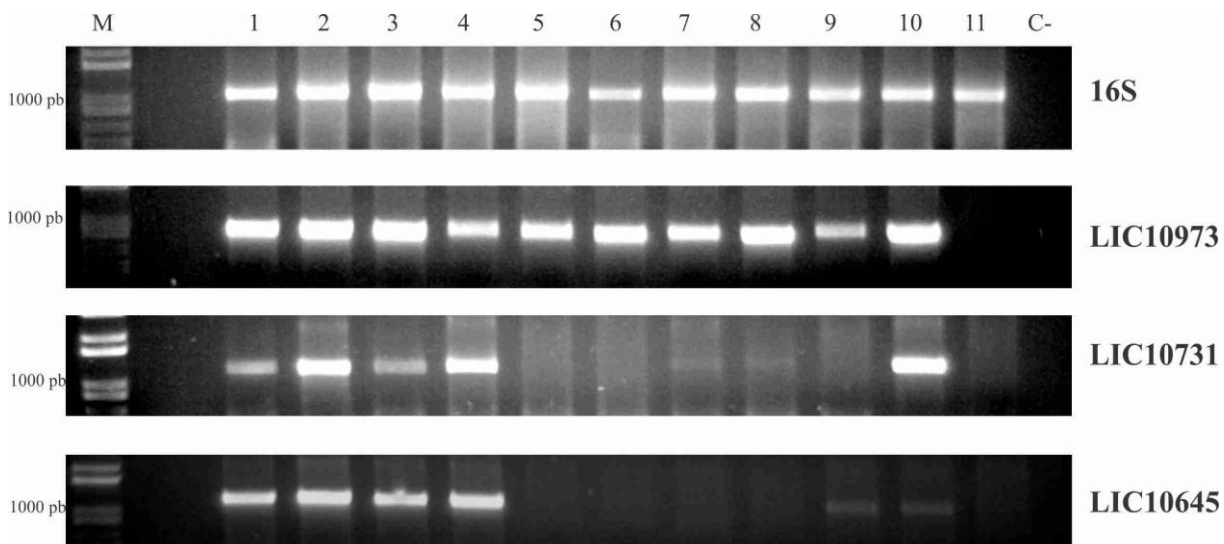
O gene LIC10731 se mostrou presente em todos os sorovares de *L. interrogans* e *L. kirshneri* testados (embora as bandas tenham sido fracas nestas últimas), em *L. noguchii* sorovar Panama, estando ausente nos sorovares de *L. borgpetersenii*, *L. santarosai* sorovar Shermani e na espécie saprofítica. De acordo com a análise *em silico*, a sequência de aminoácidos de LIC10731 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni possui 85% de similaridade com a sequência de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis.

Por meio do alinhamento das sequências, pode-se notar que a divergência maior entre elas encontra-se na região inicial e final da proteína, e por conseguinte do gene, o que pode ter causado um impedimento no anelamento dos oligonucleotídeos, sendo a mesma explicação aplicável a ausência de banda em *L. santarosai* sorovar Shermani.

O gene LIC10645 foi observado em todos os sorovares de *L. interrogans*, e com bandas mais fracas em *L. santarosai* sorovar Shermani e em *L. noguchii* sorovar Panama, o que está de acordo com a análise *em silico*, visto que foi observada uma similaridade de 81%

em relação à sequência de aminoácidos de *L. noguchii*, porém 44% em relação à sequência de *L. santarosai*. Mesmo essa última similaridade sendo baixa, provavelmente os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos se mostram conservados.

Figura 6 - Análise da presença dos genes em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* em gel de agarose (1%).



DNA genômico das espécies patogênicas *L. interrogans* sorovares: Copenhageni (1), Canicola (2), Icterohaemorrhagiae (3) Pomona (4), *L. borgpetersenii* sorovares: Castellonis (5), Whitcombi (6), *L. kirshneri* sorovares Cynoptery (7) e Grippytyphosa (8), *L. santarosai* sorovar Shermani (9), *L. noguchii* sorovar Panama (10), e da espécie saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc (11) 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 (C-).

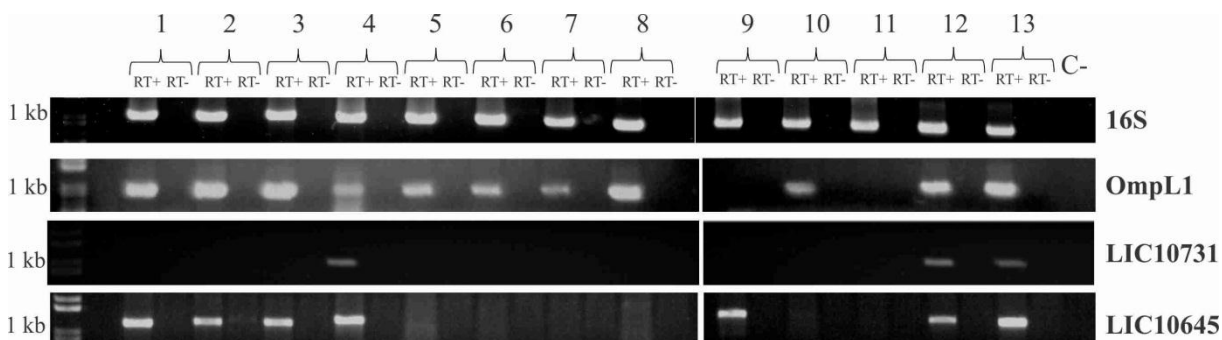
Foi realizada também uma análise da presença dos transcritos referentes aos genes *OmpL1*, LIC10731 e LIC10645, sendo que a amplificação do RNAr 16S serviu como controle da integridade das amostras.

Pela análise da Figura 7, pode-se verificar que o transcrito referente ao gene *OmpL1* foi encontrado em todas espécies e sorovares patogênicos testados, exceto *L. santarosai* sorovar Shermani, estando também ausente na cepa saprofítica *L. biflexa*. Adicionalmente, o transcrito foi identificado nas cepas virulentas.

Transcrito referente ao gene LIC10731 foi encontrado apenas na cepa atenuada *L. interrogans* sorovar Pomona, embora tenha sido encontrado nas duas cepas virulentas utilizadas, sugerindo que em *L. interrogans* sorovar Copenhageni a indução deste gene é mediada por condições encontradas no hospedeiro.

Transcrito referente ao gene LIC10645 foi encontrado em todos sorovares de *L. interrogans* testados e também em *L. santarosai* sorovar Shermani. Embora o gene tenha sido identificado também em *L. noguchi*, não foi detectado transcrito nesta espécie.

Figura 7 - Análise da presença dos transcritos em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* em gel de agarose (1%).



As amostras de cDNA das espécies patogênicas *L. interrogans* sorovares: Copenhageni (1), Canicola (2), Icterohaemorrhagiae (3) Pomona (4), *L. borgpetersenii* sorovares: Castellonis (5), Whitcombi (6), *L. kirshneri* sorovares Cynoptery (7) e Grippytyphosa (8), *L. santarosai* sorovar Shermani (9), *L. noguchii* sorovar Panama (10), da espécie saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc (11) e das cepas virulentas *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 (12) e *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm (13) 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 (C-). RT+ refere-se às amostras tratadas com a enzima transcriptase reversa e RT- às não tratadas, durante a geração do cDNA.

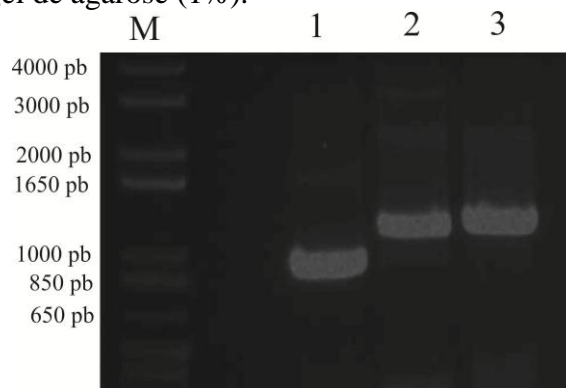
4.3 Clonagem dos genes

Os fragmentos de DNA correspondentes aos genes OmpL1, LIC10731 e LIC10645 foram amplificados a partir do DNA genômico extraído da cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni pela técnica de PCR, utilizando os oligonucleotídeos descritos no Quadro 2. Os produtos de PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e apresentaram o tamanho esperado (Figura 8).

Os fragmentos de DNA obtidos por meio da reação de PCR foram utilizados para clonagem em vetor pGEM-T Easy (Promega). Este vetor linearizado permite a seleção de colônias presumivelmente positivas para a presença do inserto (recombinantes) por meio de seleção azul/branco em placas contendo IPTG e X-Gal. Quando a enzima β -galactosidase é produzida, as colônias são capazes de degradar o substrato X-Gal, ficando então azuladas. Porém, quando o inserto é ligado ao vetor, a enzima deixa de ser produzida, o que faz com

que as colônias fiquem brancas, uma vez que agora elas são incapazes de degradar o substrato cromogênico.

Figura 8 - Visualização dos fragmentos de DNA amplificados referentes aos genes em estudo em gel de agarose (1%).



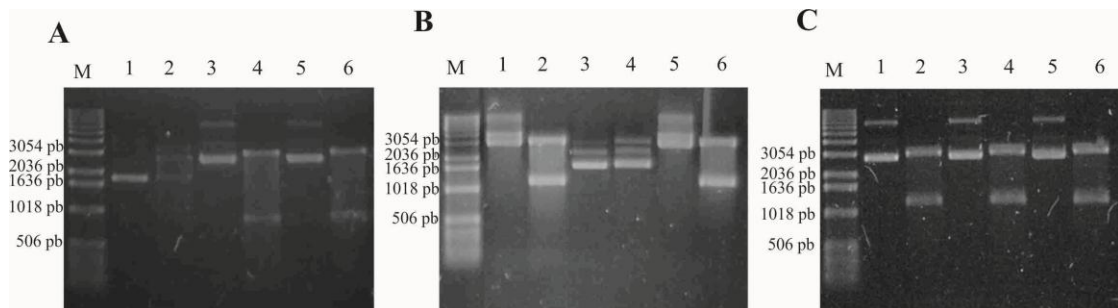
Os insertos de DNA obtidos pela técnica de PCR apresentaram os tamanhos esperados de 903 pb para OmpL1 (1), 1164 pb para LIC10731 (2) e 1212 pb para LIC10645 (3), (M) *1 Kb Plus DNA Ladder* (marcador molecular).

Após transformação em bactérias competentes, diferentes clones foram selecionados para extração de DNA, e os plasmídeos referentes aos clones foram digeridos com as enzimas de restrição que reconhecem os sítios de restrição inseridos nas extremidades 5' dos oligonucleotídeos, para certificação da presença de insertos (Figura 9).

Os insertos foram removidos dos plasmídeos recombinantes (pGEM-T Easy/inserto) por um ensaio de restrição utilizando as enzimas de restrição apropriadas, e os insertos foram purificados do gel e então subclonados no vetor de expressão pAE. Como este vetor não possui um diferencial de seleção para as colônias positivas para o inserto, deve-se fazer uma avaliação de diversas colônias obtidas, por meio de uma extração de DNA plasmidial.

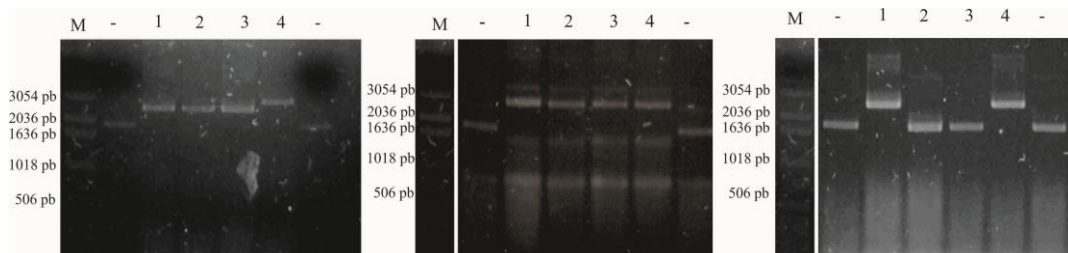
Utilizando-se uma extração rápida por fenol-clorofórmio, foram selecionados alguns clones presumivelmente positivos, ou seja, que apresentaram um aumento de massa em relação ao vetor selvagem, o que denota inclusão do inserto de interesse no vetor (Figura 10). Pode-se notar que a eficiência de ligação foi bastante alta para a OmpL1 e LIC10731, ao passo que esta eficiência foi menor para a LIC10645, sendo obtidos alguns clones negativos para a presença do inserto.

Figura 9 - Análise de restrição dos clones selecionados do vetor pGEM-T easy em gel de agarose (1%).



(A) OmpL1, (B) LIC10731 e (C) LIC10645. Sendo que M: marcador molecular (*1 Kb Plus DNA Ladder*); 1, 3 e 5: Plasmídeos de diferentes clones circularizados; 2, 4 e 6: Plasmídeos de diferentes clones digeridos com enzimas de restrição, a saber, BamHI/KpnI para OmpL1 e LIC10731 e XhoI/HindIII para LIC10645.

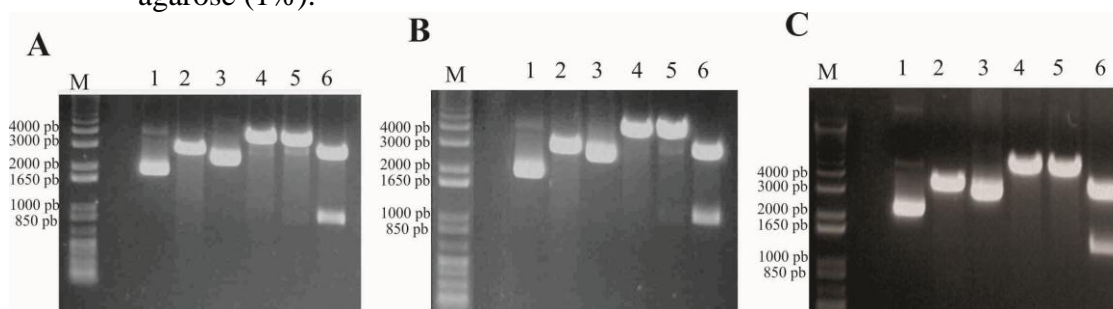
Figura 10 - Análise da extração de DNA plasmidial para seleção de clones em gel de agarose (1%).



(A) OmpL1, (B) LIC10731 e (C) LIC10645. Sendo que M: marcador molecular (*1 Kb Plus DNA Ladder*); os sinais negativos (-) se referem ao vetor pAE selvagem e circular (controle negativo), e 1-4 se referem a clones selecionados após transformação de bactérias DH5 α com o produto de ligação pAE + inserto.

Dos clones obtidos, foi escolhido um, o qual foi submetido a um ensaio de restrição (Figura 11) e sequenciamento. As construções foram sequenciadas e confirmou-se que as sequências estavam em fase de leitura correta e não possuíam quaisquer tipos de mutações. O anexo A mostra o início da construção para expressão, onde se pode notar o códon de início ATG, a região do epítipo (His)₆, os sítios de restrição originalmente existentes no sítio de clonagem múltipla do vetor pAE e o início do gene selecionado.

Figura 11 - Visualização do ensaio de restrição das construções finais pAE-gene em gel de agarose (1%).



(A) OmpL1, (B) LIC10731 e (C) LIC10645. Sendo que para (A) e (B) 1: pAE selvagem circular; 2: pAE selvagem digerido com BamHI; 3: pAE/inserto circular; 4: pAE/inserto digerido com BamHI; 5: pAE/inserto digerido com KpnI; 6: pAE/inserto digerido com BamHI e KpnI. Para (C) 1: pAE selvagem circular; 2: pAE selvagem digerido com XhoI; 3: pAE/inserto circular; 4: pAE/inserto digerido com XhoI; 5: pAE/inserto digerido com HindIII; 6: pAE/inserto digerido com XhoI e HindIII; M: marcador molecular (*1 Kb Plus DNA Ladder*).

4.4 Expressão das proteínas recombinantes

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

Na Tabela 1 estão descritos os resultados dos cálculos de massa molecular esperada e PI (ponto isoelétrico) teórico das proteínas recombinantes que foram realizados a partir da composição de aminoácidos do cassete de expressão, utilizando o programa ProtParam - <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>.

Tabela 1 - Massa molecular e PI teórico das proteínas recombinantes

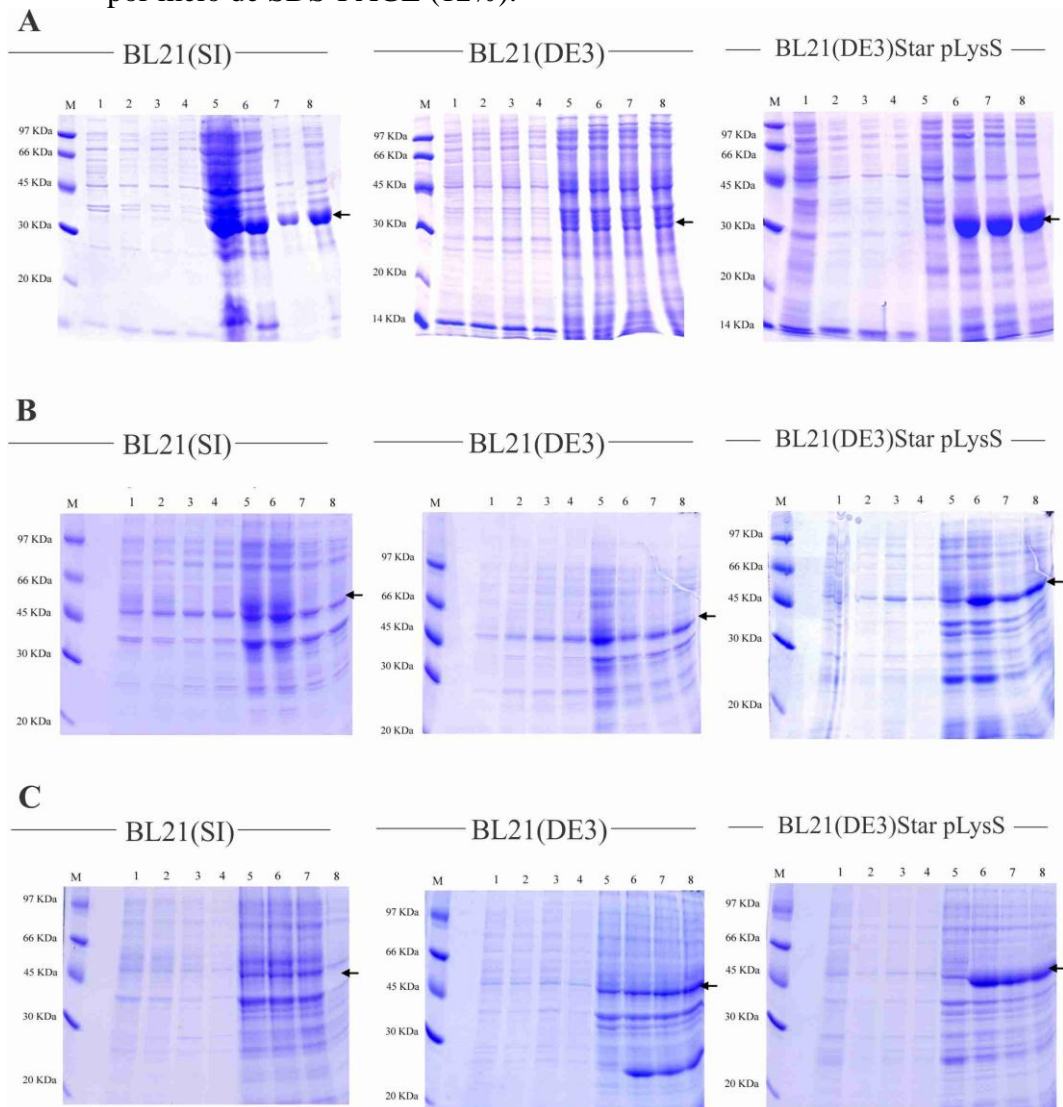
Gene ID	Massa molecular (Da)	pI teórico
LIC10973 (OmpL1)	32401.6	7.16
LIC10731	44725.3	8.69
LIC10645	43806.2	4.96

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

Bactérias *E. coli* foram transformadas e a expressão dos genes heterólogos induzida por diferentes concentrações de indutor. As concentrações utilizadas foram 5, 50 e 500 mM quando o indutor foi NaCl, e 0,01, 0,1 e 1 mM para as cepas na qual indutor foi o IPTG .

Após indução, as bactérias foram lisadas e as frações proteicas obtidas (sobrenadante e sedimento) analisadas em gel de SDS-PAGE 12% (Figura 12).

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



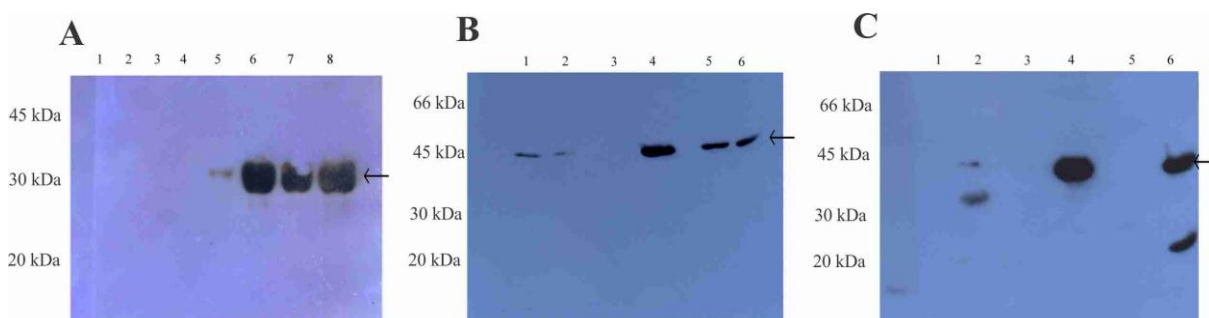
Géis do teste de expressão em diferentes cepas para as proteínas OmpL1 (A), rLIC10731(B) e rLIC10645 (C). M: padrão de massa molecular. 1. Sobrenadante não induzido; 2. Sobrenadante induzido com 5 mM NaCl (para cepa SI) ou 0.01 mM de IPTG; 3. Sobrenadante induzido com 50 mM NaCl (para cepa SI) ou 0.1 mM de IPTG; 4. Sobrenadante induzido com 500 mM NaCl (para cepa SI) ou 1 mM de IPTG; 5. Fração insolúvel não induzida; 6. Fração insolúvel induzida com 5 mM NaCl (para cepa SI) ou 0.01 mM de IPTG; 7. Fração insolúvel induzida com 50 mM NaCl (para cepa SI) ou 0.1 mM de IPTG; 8. Fração insolúvel induzida com 500 mM NaCl (para cepa SI) ou 1 mM de IPTG.

Foi feito um ensaio de *Western blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-His para confirmar a expressão das proteínas recombinantes (Figura 13). Para as proteínas rLIC10731 e rLIC10645 que tiveram uma expressão aparentemente menos notória, foi

realizado um *Western blotting* das frações solúveis e insolúveis das três cepas testadas, na maior concentração do indutor.

A proteína rLIC10731 foi melhor expressa na cepa BL21 (DE3) Star pLysS, embora também tenha sido expressa nas outras cepas em menor concentração e com uma partição de expressão na fração solúvel e insolúvel. A proteína rLIC10645 também foi melhor expressa na cepa BL21 (DE3) Star pLysS, além de não sofrer degradação nesta cepa. Para OmpL1, a melhor expressão na cepa BL21 (DE3) Star pLysS foi muito evidente pela simples análise visual dos géis, portanto, apenas as frações referentes a esta cepa foram carregadas ao gel e transferidas para membrana de nitrocelulose para realização do ensaio de *Western blotting*.

Figura 13 - Análise das frações de cultura bacteriana após indução de expressão das proteínas recombinantes utilizando anticorpo anti-his por *Western blotting*.



As frações de interesse foram aplicadas a um gel SDS-PAGE 12% e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-his conjugado com peroxidase (1:2.000) para detecção das proteínas recombinantes. Em (A) tem-se as frações solúveis (1-4) e insolúveis (5-8) em concentrações crescentes do indutor na cepa BL21(DE3) Star pLysS para a proteína OmpL1. Em (B) e (C) tem-se as frações solúveis e insolúveis para maior concentração do indutor para as proteínas rLIC10731 e rLIC10645, respectivamente. 1. Cepa BL21(SI) fração solúvel; 2. Cepa BL21(SI) fração insolúvel; 3. Cepa BL21(DE3)Star pLysS fração solúvel; 4. Cepa BL21(DE3)Star pLysS fração insolúvel; 5. Cepa BL21(DE3) fração solúvel; 6. Cepa BL21(DE3) fração insolúvel.

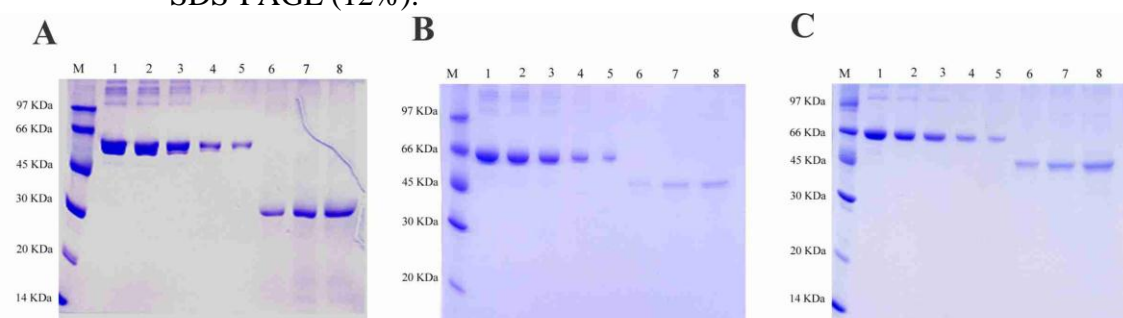
Todas as proteínas recombinantes foram melhor expressas na forma insolúvel, como corpúsculo de inclusão, e tiveram uma melhor expressão na cepa BL21(DE3) Star pLysS. Esse resultado já era esperado para a proteína OmpL1, já que foi descrito que esta proteína apresenta uma certa toxicidade para *E. coli*, podendo limitar seu crescimento (SHANG et al., 1995). Assim, a expressão da lisosima para a polimerase T7 garante que a recombinante seja expressa apenas na presença do indutor (STUDIER, 1991).

4.5 Purificação e diálise das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas recombinantes expressas foi feita por meio de cromatografia de afinidade ao metal, utilizando-se de uma resina tratada com níquel em sua forma catiônica. Como o vetor de expressão pAE adiciona uma sequência de seis resíduos de histidina, (His)₆, na extremidade N-terminal da proteína recombinante, esta se liga a resina impregnada com níquel, ao passo que os contaminantes proteicos da cultura se ligam fracamente à resina, sendo então subsequentemente lavados com tampão contendo baixa concentração de imidazol. A proteína recombinante é eluída por meio de um tampão contendo alta concentração de imidazol.

Como todas as proteínas foram expressas na forma insolúvel, estas foram solubilizadas em tampão de desnaturação, contendo 8 M ureia, a qual foi posteriormente removida. O sistema utilizado para purificação das proteínas foi o de diluição por gotejamento em tampão de *refolding*, seguido de purificação com *Chelating Sepharose*. Após diálise em tampão apropriado (PBS para OmpL1, 500 mM NaCl e 20 mM Tris-pH 8 para rLIC10731 e rLIC10645), a concentração das proteínas recombinantes foi estimada. As concentrações foram de 0,1 µg/µL para OmpL1, 0,08 µg/µL para rLIC10731 e 0,15 µg/µL para rLIC10645. Como esperado, bandas majoritárias de cerca de 32,4, 44,7 e 43,8 kDa correspondentes as proteínas OmpL1, rLIC10731 e rLIC10645, respectivamente, foram observadas em SDS-PAGE 12% (Figura 14).

Figura 14 – Estimativa da concentração das proteínas recombinantes purificadas em gel SDS-PAGE (12%).



(A) OmpL1, (B) rLIC10731 e (C) rLIC10645. M: massa molecular. 1-5: BSA contendo as massas de 4, 3, 2, 1 e 0,5 µg, respectivamente; 6-8: proteína aplicada no gel SDS-PAGE nas quantidades de 5, 10 e 15 µL, respectivamente. As bandas de proteína recombinante foram comparadas por densitometria com as bandas de BSA, para cálculo da concentração das alíquotas de proteína.

O rendimento das purificações, expresso em miligramas de proteína recombinante por litro de cultura de *E. coli* (mg/L), foi de 10 para OmpL1, 4,725 para rLIC10731 e 22,275 para rLIC10645.

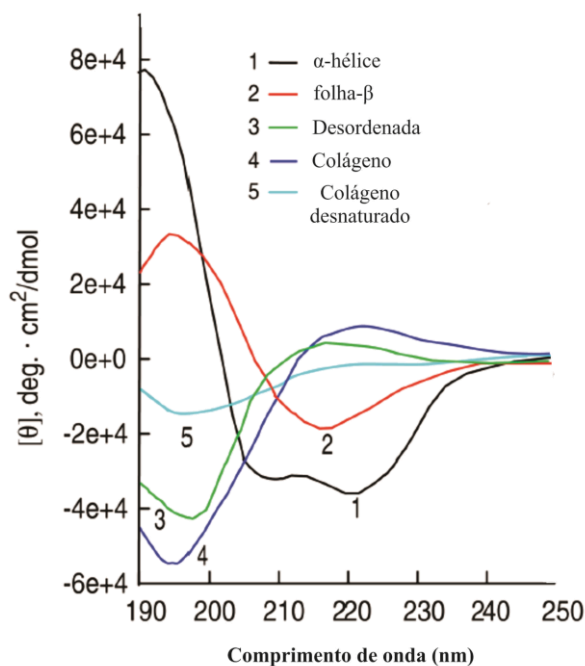
4.6 Dicroísmo circular

Informações sobre a estrutura de proteínas são importantes para que se possa compreender suas funções (VAN STOKKUM et al., 1990). A técnica de dicroísmo circular é uma ferramenta importante no estudo da conformação de biomoléculas, especialmente peptídeos e proteínas (SREERAMA; WOODY, 1994), as quais possuem dicroísmo circular característico relacionado à presença de estruturas secundárias.

Esta técnica se baseia na absorção desigual da luz circularmente polarizada, uma vez que moléculas assimétricas (quirais) interagem com a luz (GREENFIELD, 2006). Diferentes elementos estruturais contidos nas proteínas possuem espectros característicos. Proteínas com predomínio de α -hélice apresentam dois picos negativos (aproximadamente 208 e 222 nm) e um pico positivo (aproximadamente 193 nm), e proteínas com predomínio de folhas- β antiparalelas apresentam um pico negativo em aproximadamente 218 nm e um pico positivo em 195 nm. Proteínas com estruturas randômicas, ou seja, não ordenadas, apresentam sinal muito baixo e um pico negativo próximo a 195 nm (Figura 15).

Pela visualização dos espectros gerados (Figura 16), pode-se inferir que a proteína OmpL1 apresenta um predomínio de folhas- β , o que é visto pela presença de um pico negativo em torno de 218 nm e um pico negativo próximo a 195 nm. A predição da porcentagem de estruturas secundárias pelo software K2D3 (LOUIS-JEUNE; ANDRADE-NAVARRO; PEREZ-IRATXETA, 2011) confirma a predominância de estruturas do tipo folha- β (34% de folha- β contra 14% de α -hélices). O espectro gerado está de acordo com a estrutura predita da proteína nativa OmpL1, caracterizada como uma proteína integral de membrana, cujo modelo topológico contém 10 folhas- β anfipáticas transmembrana (HAAKE et al., 1993; SHANG et al., 1995).

Figura 15 - Espectros característicos de proteínas com predomínio de determinada estrutura secundária.



O gráfico representa espectros característicos de proteínas com predomínio de determinada estrutura secundária.

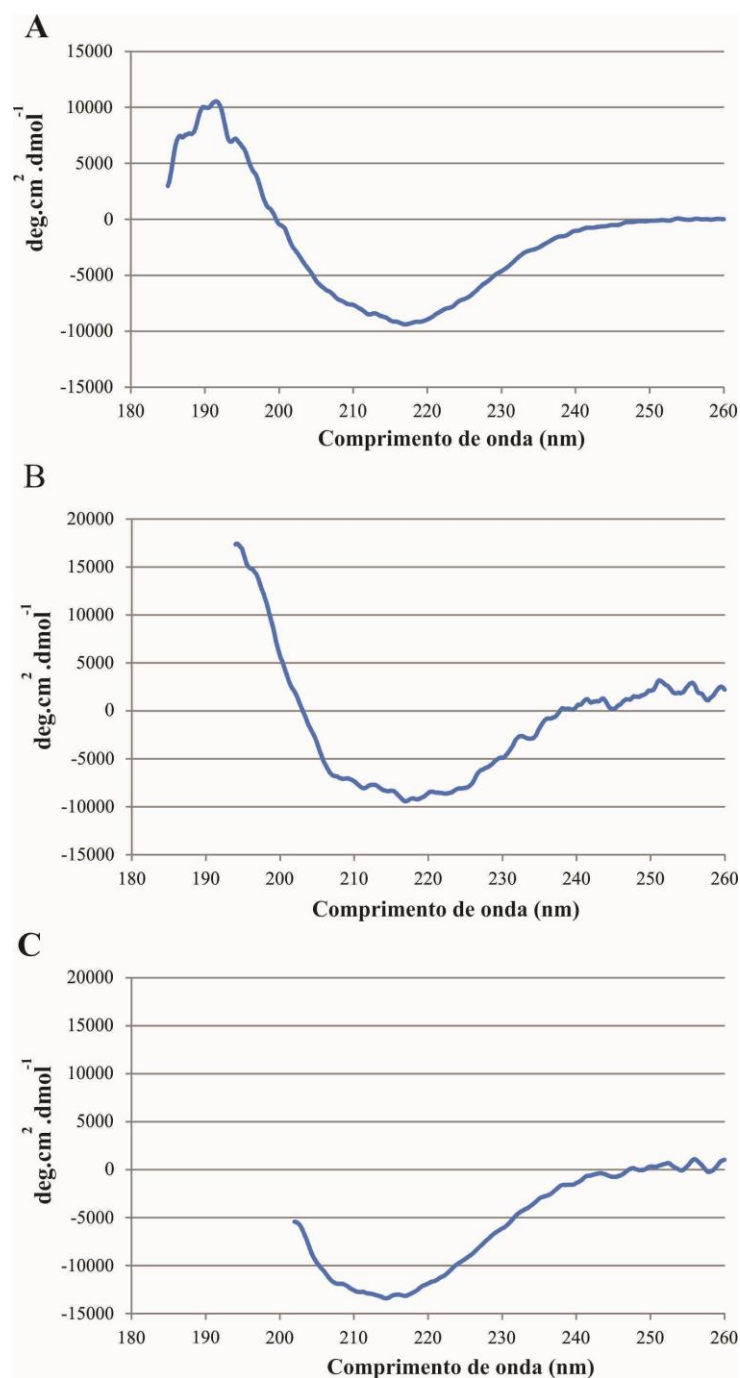
Fonte: Modificado de Greenfiel (2006).

Não foi possível gerar os espectros completos para as proteínas rLIC10731 e rLIC10645, não sendo então vislumbrados os picos positivos. Porém, o espectro parcial sugere uma predominância de estruturas do tipo folha-β para rLIC10731, o que é denotado pelo pico negativo típico em aproximadamente 218 nm. Para a proteína rLIC10645, foi verificado um pico negativo próximo de 218 nm, embora este seja mais negativo do que os picos observados para as proteínas OmpL1 e rLIC10731, o que sugere a presença de estruturas do tipo α-hélice.

A predição pelo software K2D3 definiu que a proteína rLIC10731 possui 10,7% de α-hélice e 32% de folha-β, e a proteína rLIC10645 possui 28,7% de α-hélice e 15,1% de folha-β.

Os resultados mostram que as três proteínas recombinantes obtidas após purificação e diálise estão estruturadas (Figura 16), o que nos dá segurança para prosseguir nos estudos de caracterização e avaliação imunológica destas proteínas.

Figura 16 - Espectros gerados pela análise de dicroísmo circular para as proteínas recombinantes.



Espectros de dicroísmo circular para as proteínas **(A)** OmpL1, **(B)** rLIC10731 e **(C)** rLIC10645. As medições de espectroscopia circular foram feitas a 20 °C em um espectropolarímetro equipado com uma unidade Peltier para controle de temperatura. O espectro foi medido usando uma célula de 1 mm a intervalos de 0,5 nm, e apresentado como uma média de cinco leituras.

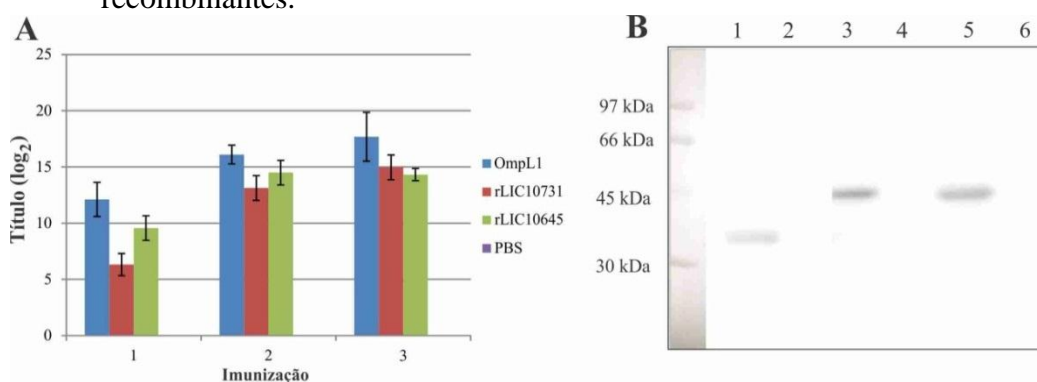
4.7 Avaliações imunológicas

Um melhor entendimento da resposta imune desencadeada por antígenos recombinantes de *Leptospira* spp. pode fornecer novas perspectivas sobre os mecanismos de imunidade anti-*Leptospira* e então facilitar o desenvolvimento de uma vacina recombinante.

Para tanto, camundongos BALB/c foram imunizados pela via subcutânea com 10 µg de cada proteína recombinante, tendo *Alhydrogel* (2% Al(OH)₃) como adjuvante, em intervalos de 15 dias.

Todas as proteínas promoveram a produção de altos títulos de anticorpos nos animais imunizados, sendo a proteína OmpL1 a mais imunogênica ao final de três imunizações. Não foi detectada reatividade do soro dos animais controle (imunizados com PBS e adjuvante) contra as proteínas. Os anticorpos gerados foram capazes de reconhecer as proteínas recombinantes, o que é demonstrado pela presença de uma banda única referente a cada proteína no ensaio de *Western blotting* (Figura 17).

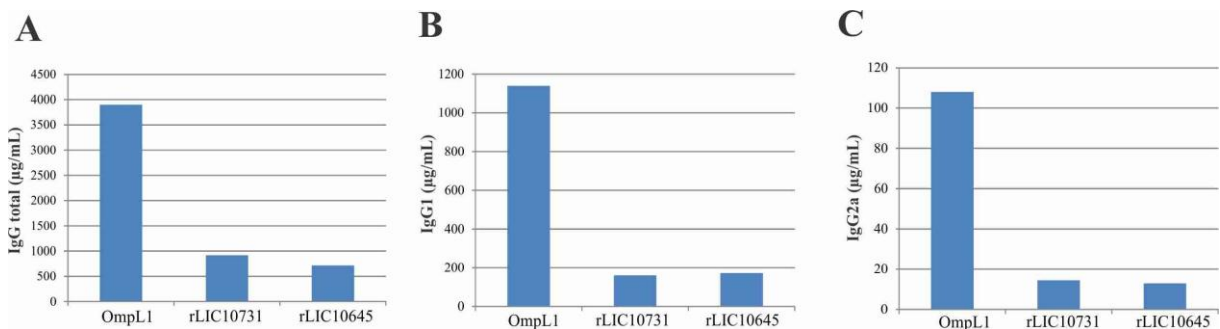
Figura 17 - Produção de anticorpos IgG pela imunização de camundongos com as proteínas recombinantes.



(A) quinze dias após cada imunização, os animais foram sangrados e foi feita a detecção de anticorpos IgG anti-proteína recombinante. As proteínas foram imobilizadas em placas de ELISA (250 ng de proteína/poço) e então foram adicionadas diluições seriadas do antissoro aos poços. Após incubação, a detecção do sinal foi feita por incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5.000). As barras indicam a média do log₂ do título dos animais ± o desvio padrão. (B) visualização da reatividade dos anticorpos gerados contra as proteínas recombinantes por *western blotting*. As proteínas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose, as quais foram bloqueadas com solução de 10% leite e então incubadas com antissoro específico nas diluições 1:1.600 para anti-OmpL1 e 1:800 para anti-rLIC10731 e anti-rLIC10645. Foi feita incubação com anti-IgG de camundongo e a detecção da reatividade foi feita a partir do substrato quimioluminescente ECL. 1. OmpL1 incubada com soro imune anti-OmpL1; 2. OmpL1 incubada com soro de animais imunizados com PBS; 3. rLIC10731 incubada com soro imune anti-rLIC10731; 4. rLIC10731 incubada com soro de animais imunizados com PBS; 5. rLIC10645 incubada com soro imune anti-rLIC10645; 6. rLIC10645 incubada com soro de animais imunizados com PBS.

A quantificação e isotipagem dos anticorpos IgG presentes no *pool* dos soros resultantes da terceira imunização dos animais confirma o padrão obtido nas titulações (Figura 18) e demonstra uma predominância de IgG1 em todos os grupos. Nenhuma reatividade foi detectada após incubação com o soro dos animais controle.

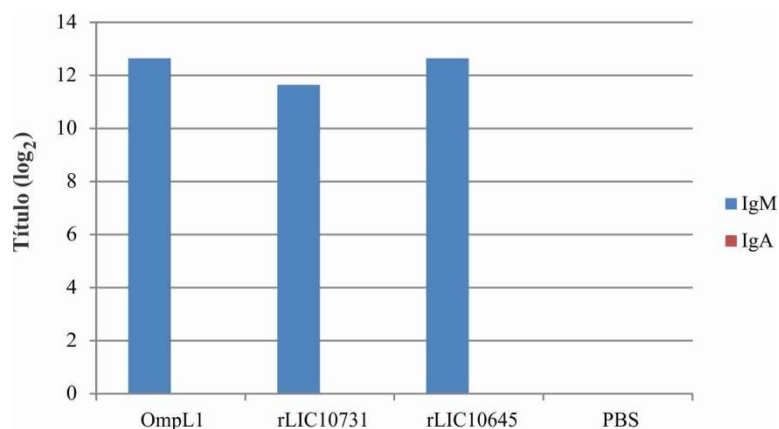
Figura 18 - Isotipagem e quantificação dos anticorpos IgG nos soros de animais imunizados com as proteínas recombinantes.



Anticorpos IgG totais (A) e subclasses IgG1 (B) e IgG2a (C) foram quantificados a partir de comparação entre valores de absorbância obtidos pela reatividade do pool do soro dos animais resultante da terceira imunização contra cada proteína recombinante e os valores de absorbância obtidos a partir de uma curva padrão para cada anticorpos, gerada a partir de diluições seriadas de uma massa conhecida. Para a determinação de IgG total, foi feita a incubação com anticorpo anti-IgG total de camundongo (1:5.000) e para determinação dos isotipos, foi feita a incubação com anti-IgG1 ou IgG2a de camundongo (1:2.000) seguida de incubação com anticorpo anti-cabra conjugado com peroxidase (1:20.000).

Adicionalmente, foi feita a detecção de anticorpos IgA e IgM contra as proteínas recombinantes, sendo que apenas IgM foi encontrado após a terceira imunização (Figura 19), o que é esperado, visto que existe um fundo de linfócitos B *naïves* que são estimulados a cada imunização, produzindo assim anticorpos do isotipo IgM (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Os títulos para IgM foram 6.400 para OmpL1 e rLIC10645 e 3.200 para rLIC10731 (12,6 e 11,6 em log₂, respectivamente). Os animais imunizados com PBS (controle) não apresentaram reatividade.

Figura 19 - Detecção de anticorpos IgM e IgA contra as proteínas recombinantes nos soros dos camundongos imunizados.



Foi feita a detecção de anticorpos IgM (A) ou IgA (B) contra as proteínas recombinantes. Para tal, foi feito o pool dos soros dos animais resultantes da terceira imunização e estes foram incubados, em diferentes diluições, com 250 ng de proteína/poço. A detecção da reatividade foi feita por adição de anti-IgM de camundongo (diluição seriada) seguido de incubação com anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase ou anti-IgA de camundongo conjugado com peroxidase, ambos na diluição de 1:5.000. A revelação foi feita com utilização do substrato cromogênico OPD.

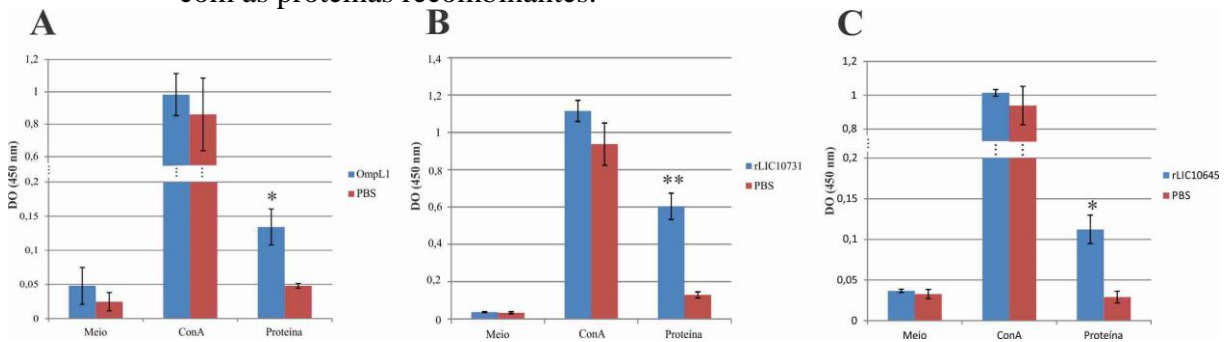
Após os protocolos de imunização, os camundongos foram sacrificados, seus baços foram extraídos e processados, para subsequente cultura celular. As células de todos os grupos se mostraram viáveis, o que é observado pela alta proliferação dos esplenócitos estimulados com o mitógeno ConA, o qual é uma lectina (proteína ligante de carboidrato) com alto potencial de induzir mitose.

Todas as proteínas recombinantes induziram uma resposta celular, denotada pela proliferação dos esplenócitos quando estes foram estimulados *in vitro* pelos antígenos (Figura 20). A proliferação foi modesta para as células obtidas do grupo imunizado com rLIC10645 e OmpL1 e bem expressiva para o grupo rLIC10731.

A Tabela 2 mostra os índices de estimulação (razão entre os valores de OD450 nm observados nas células estimuladas com a proteína recombinante e células sem estímulo, dentro do grupo dos animais imunizados) apresentados pelas diferentes proteínas recombinantes.

O sobrenadante da cultura celular foi avaliado quanto à presença de citocinas secretadas (Figura 21). As citocinas IL-10, IL-4, IFN- γ e TNF- α foram utilizadas para discriminar uma resposta celular-Th1 (IFN- γ e TNF- α) e humoral-Th2 (IL-10 e IL-4).

Figura 20 - Avaliação das respostas celulares apresentada pelos camundongos imunizados com as proteínas recombinantes.



A proliferação de linfócitos foi analisada a partir de células de baço de camundongos imunizados com OmpL1 (A), rLIC10731 (B) ou rLIC10645 (C) ou animais controle, imunizados com PBS. As células foram cultivadas e então estimuladas com meio (controle negativo), mitógeno ConA (controle positivo, 5 µg/mL) ou proteína recombinante (5 µg/mL). A resposta de proliferação foi medida pelo ensaio colorimétrico ELISA-BrdU. Os valores representam o valor de $DO \pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes. As comparações para análise estatística foram feitas pelo teste t-Student entre o tratamento proteína e meio, dentro do grupo dos animais imunizados (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

Tabela 2 - Índices de estimulação induzidos pelas proteínas recombinantes

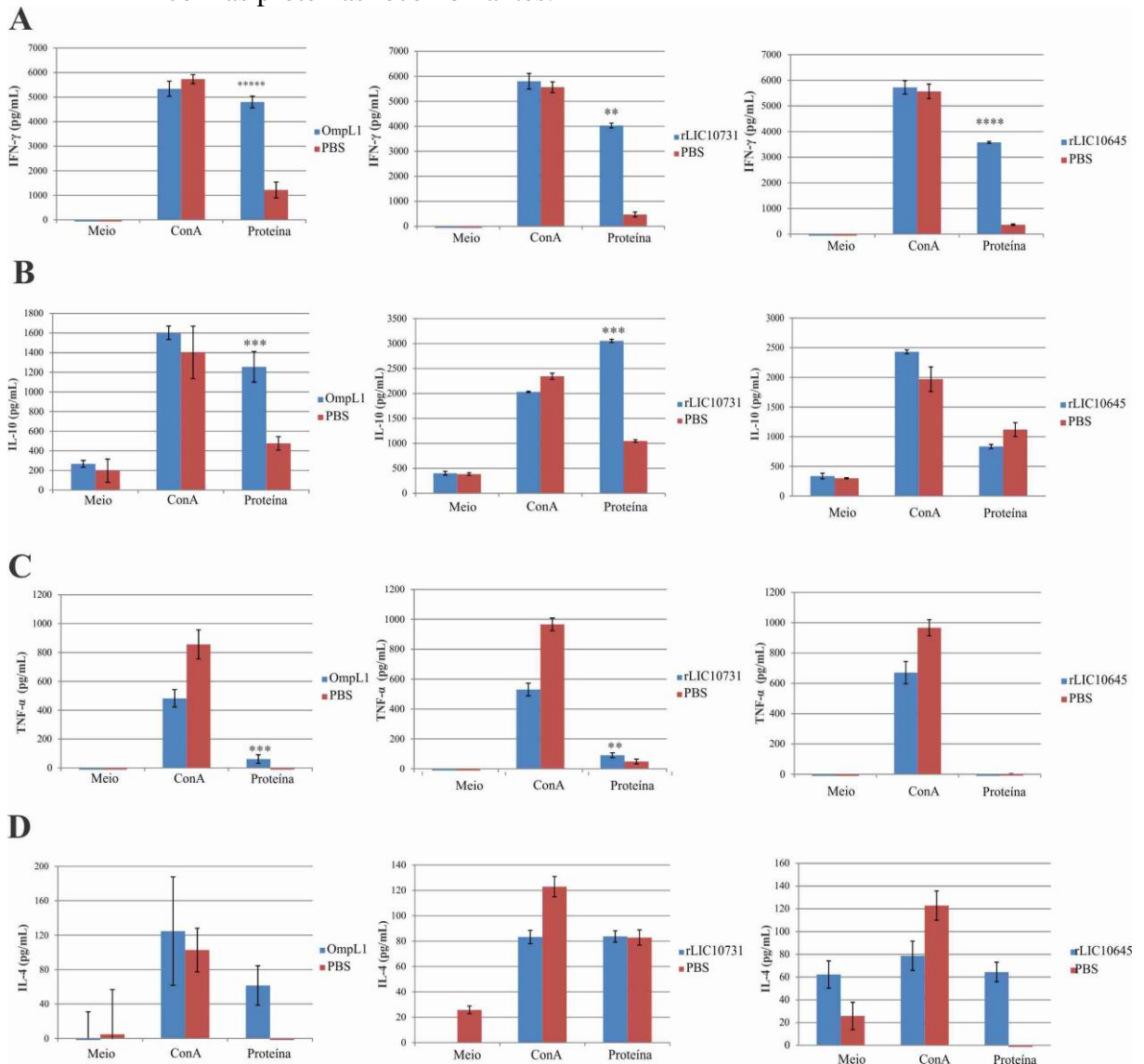
Proteína	Índice de Estimulação
OmpL1	2,8
rLIC10731	16,44
rLIC10645	3,06

Nota: Os índices de estimulação foram calculados com base nos valores de absorbância apresentados na Figura 20.

Aumento significativo de IFN- γ foi obtido em todos os grupos estudados, atingindo valores de concentração próximos ao tratamento com mitógeno ConA. O estímulo com a proteína OmpL1 também promoveu a secreção de IL-10 e TNF- α , embora este último em baixas concentrações. Houve uma combinação de perfil Th1/Th2 para o grupo imunizado com OmpL1, o que é denotado tanto pelo perfil de citocinas quanto pelo aumento dos títulos de anticorpos no decorrer das imunizações.

Lin et al. (2011) avaliaram os epítomos combinados para linfócitos B e T presentes na proteína OmpL1 quanto à resposta imune promovida em camundongos BALB/c, e observaram que os epítomos selecionados foram capazes de induzir uma resposta do tipo Th1, denotado pelos altos níveis de IFN- γ produzidos.

Figura 21 - Avaliação da resposta de citocinas resultante da imunização de camundongos com as proteínas recombinantes.



Células de baço foram isoladas dos animais imunizados e cultivadas em placa de cultura de 24 poços. Após 48 horas, o sobrenadante da cultura foi coletado e as citocinas IFN- γ (**A**), IL-10 (**B**), TNF- α (**C**) e IL-4 (**D**) foram dosadas por um kit de ELISA sanduiche de acordo com as instruções do fabricante. Os valores de absorbância obtidos foram comparados com os valores de uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de cada citocina. Para análise estatística, primeiramente foi avaliada a diferença entre as médias do tratamento no qual as células foram estimuladas com a proteína, entre o grupo imunizado e grupo PBS (controle negativo). Sendo detectada diferença significativa, a análise estatística foi então feita dentro do grupo dos animais imunizados entre o tratamento proteína e meio, pelo teste t-Student, e o p-valor mostrado no gráfico se refere a esta última análise (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $p < 0,0001$ e ***** $p < 0,00001$).

O grupo imunizado com rLIC10731 também apresentou um aumento significativo nas citocinas IL-10 e TNF- α após estimulação com o antígeno. No que tange a citocina IL-4, não foi detectado aumento significativo nos níveis desta citocina; embora as células do grupo

imunizado com rLIC10731 tenha tido um aumento nos níveis desta citocina quando estimulados com mesma proteína em comparação às células deste grupo cultivadas sem estímulo (meio), o mesmo foi observado para as células oriundas do grupo PBS, o que nos leva a concluir que o aumento desta citocina não se deve ao efeito da imunização, e sim exclusivamente às condições de cultura.

Estes resultados podem ser explicados em parte pelo efeito exercido pelo sal de alumínio, empregado como adjuvante, o qual é capaz de estimular ambas as respostas Th1 e Th2 (MARRACK; MCKEE; MUNKS, 2009). De fato, Vernel-Pauillac e Merien (2006) demonstraram que leptospiros patogênicas promovem uma resposta Th1 juntamente com a produção de anticorpos anti-lipopolissacarídeos em modelo animal.

4.8 Reatividade com soro de hamster e pacientes

Com o objetivo de identificar se as proteínas estudadas são expressas no momento da infecção, bem como avaliar o potencial das respectivas proteínas recombinantes na composição de um kit diagnóstico, foi avaliada a reatividade destas frente a soros de hamsters experimentalmente infectados (n=44) e soros pareados (n=32, fase convalescente, MAT+ e fase aguda, MAT-) de pacientes diagnosticados com leptospirose.

Um pré-requisito para o controle de doenças infecciosas é a disponibilidade de testes de diagnóstico sensíveis, confiáveis e baratos. O teste de microaglutinação (MAT) é considerado o teste padrão, porém é um teste que exige controle e interpretação complexos, além de sua baixa sensibilidade na fase inicial da doença, uma vez que depende de anticorpos contra antígenos de leptospiros, os quais não são detectados nos primeiros dias após a exposição ao patógeno (BAJANI et al., 2003; CUMBERLAND; EVERARD; LEVETT, 1999; HULL-JACKSON et al., 2006; PLANK; DEAN, 2000).

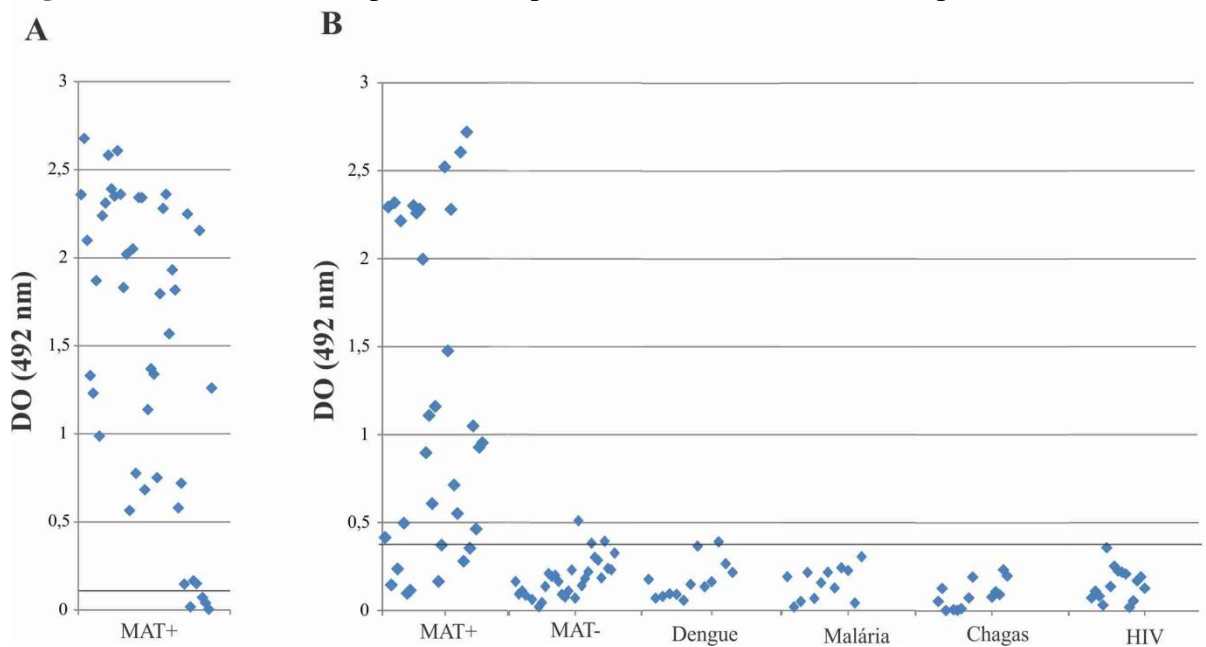
A identificação de antígenos de *Leptospira* spp. que possam ser reconhecidos na fase inicial da doença, como as proteínas Lp29 (NEVES, 2007), MPL17 e MPL21 (OLIVEIRA et al., 2008) poderão facilitar o diagnóstico e tratamento precoce da doença.

O potencial da proteína OmpL1 como marcador de diagnóstico para leptospirose já foi bastante estudado (DONG et al., 2008; FLANNERY et al., 2001; NATARAJASEENIVASAN et al., 2008; QIU et al., 2008; SUN et al., 2011). Conforme esperado, foram detectados anticorpos anti-OmpL1 tanto no soro de hamsters infectados experimentalmente com leptospiros (90% de respondedores) quanto no soro de pacientes diagnosticados com leptospirose (75% de respondedores na fase MAT+ e 9% na fase MAT-)

(Figura 22). O valor *cutoff* calculado a partir da reação com soros humanos normais foi de 0.374. Devido aos sintomas clínicos pouco específicos da leptospirose, foi analisada a reatividade da proteína OmpL1 com amostras de soros obtidos a partir de pacientes acometidos com doenças febris não relacionadas e que não apresentaram histórico de leptospirose.

A reatividade obtida para estas amostras se mostrou abaixo do valor *cutoff* e a especificidade foi calculada como 100% para todas as doenças não relacionadas exceto dengue, para a qual a especificidade foi de 92,3%.

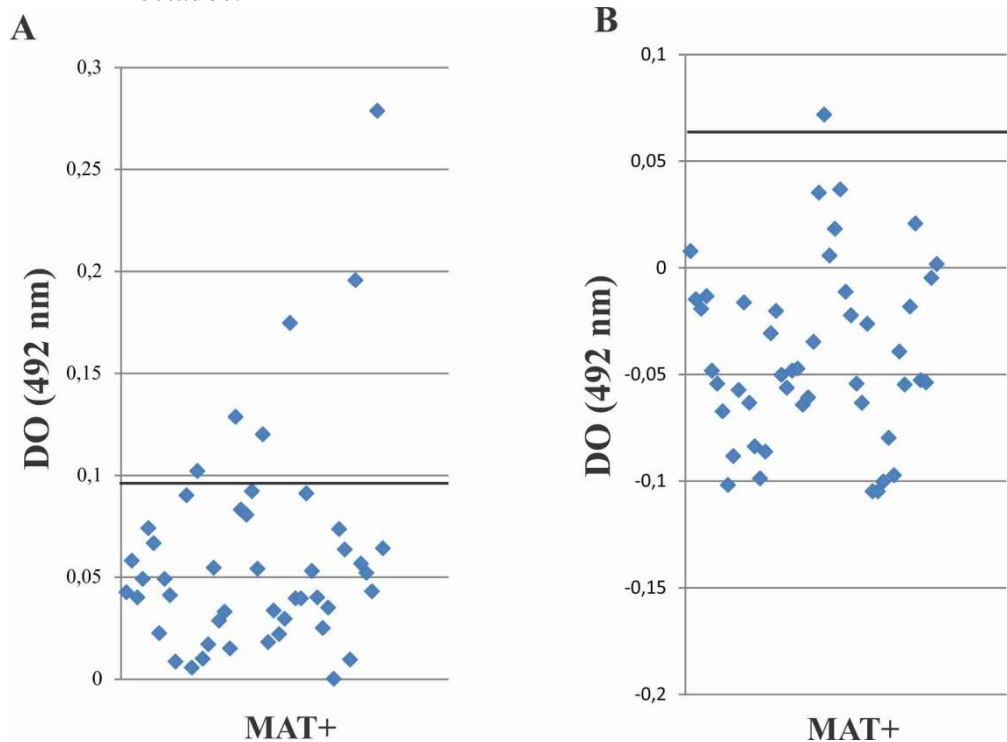
Figura 22 - Reatividade da proteína OmpL1 com soro de hamsters e de pacientes.



Reatividade positiva (respondedores) foi determinada por ELISA com a proteína recombinante OmpL1 imobilizada (250 ng/poço). **(A)** refere-se a reatividade de soros de hamster experimentalmente infectados, todos MAT+, e **(B)** a soros de pacientes com leptospirose, em fase convalescente (MAT+) ou aguda (MAT-), e soros de pacientes acometidos por doenças febris não relacionadas. A reatividade foi avaliada por meio de anticorpos IgG totais, detectados por meio de incubação com anticorpos anti-IgG de hamster ou anti-IgG humano, ambos conjugados com peroxidase e na diluição de 1:3.000. Os valores de corte (*cutoff*), representados pela barra horizontal, são definidos como a média mais três desvios-padrão dos valores de absorbância de 8 indivíduos normais ou 5 hamsters livres de infecção.

O reconhecimento de anticorpos em soro de hamsters infectados foi menor para rLIC10731 e rLIC10645. Enquanto para a rLIC10731 foi observado um total de 11,5% de respondedores, para a rLIC10645 este valor foi de apenas 1,8% (Figura 23).

Figura 23 - Reatividade das proteínas rLIC10731 e rLIC10645 com soro de hamsters infectados.

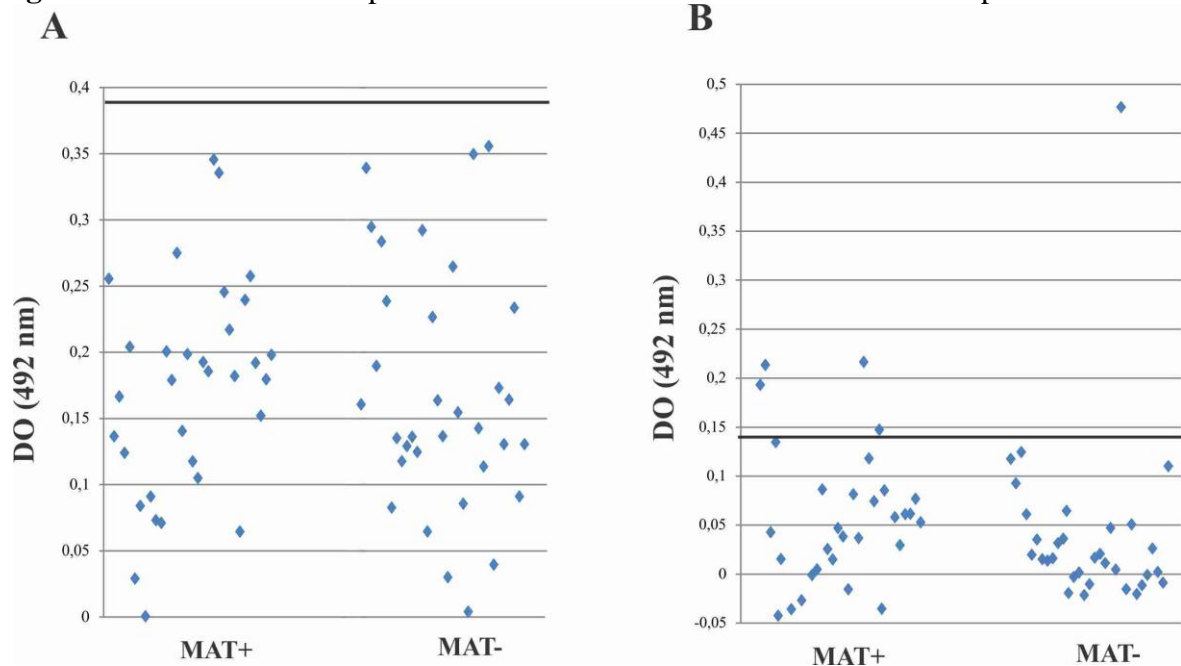


As proteínas rLIC10731 (A) e rLIC10645 (B) foram imobilizadas em placa de ELISA (250 ng/poço) e incubadas com soro de hamsters infectados experimentalmente com *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm, na diluição de 1:100. A detecção da reatividade foi feita por incubação com anti-IgG de hamster conjugado com peroxidase (1:3.000). Os respondedores são considerados como aqueles acima do valor cutoff (linha horizontal), definida como a média somada a três vezes o desvio padrão de 5 animais não infectados.

A reatividade com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose foi de 0% para rLIC10731, tanto para MAT+ quanto MAT- (valor *cutoff* calculado de 0,397) e de 12,5% na fase MAT+ e 3% na fase MAT- para rLIC10645 (valor *cutoff* calculado de 0,141) (Figura 24).

Estes resultados dão um indício de que a proteína OmpL1 é expressa durante a infecção, o que corrobora os resultados obtidos por (BARNETT et al., 1999).

Figura 24 - Reatividade das proteínas rLIC10731 e rLIC10645 com soro de pacientes.



As proteínas rLIC10731 (A) e rLIC10645 (B) foram imobilizadas em placa de ELISA (250 ng/poço) e incubadas com soro pareados de pacientes diagnosticados com leptospirose, na fase convalescente (MAT+) e aguda (MAT-), na diluição de 1:100. A detecção da reatividade foi feita por incubação com anti-IgG humano conjugado com peroxidase (1:3.000). Os respondedores são considerados como aqueles acima do valor cutoff (linha horizontal), definida como a média somada a três vezes o desvio padrão de 8 indivíduos normais.

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

A identificação de proteínas conservadas em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* spp. é um critério importante para o desenvolvimento de um teste diagnóstico baseado em proteínas recombinantes (OLIVEIRA et al., 2008) e para o desenvolvimento de uma vacina eficiente (CULLEN et al., 2002; HAAKE et al., 1999).

Assim, foi avaliada a presença das proteínas em extratos de *Leptospira* por meio de *Western blotting*. Os extratos foram separados em SDS-PAGE 12% e eletrotransferidos para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com antissoro anti-proteína recombinante e anticorpos secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase.

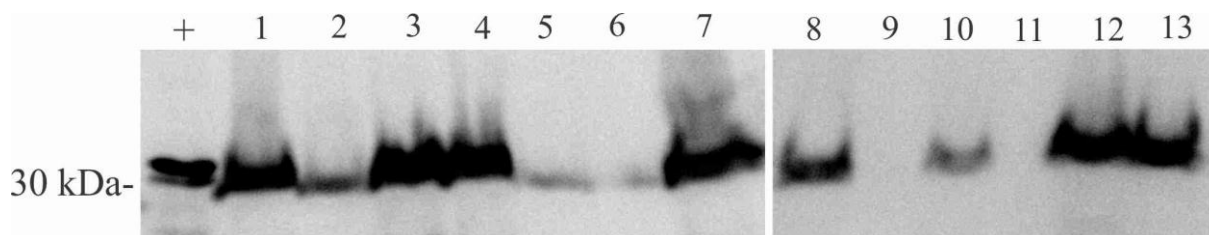
Pode-se verificar na Figura 25 que a reatividade sorológica mostra a conservação de epítipo de OmpL1 nos principais sorovares de *Leptospira*, embora algumas espécies tenham apresentado bandas mais fracas. Não foi detectada banda referente à proteína OmpL1 em *L. santarosai* serovar Shermani e na espécie saprofítica *L. biflexa*. A proteína também foi

detectada nas cepas virulentas de *L. interrogans* utilizadas, o que está de acordo com o estudo da presença dos transcritos.

Embora a proteína OmpL1 tenha sido detectada por análise *in silico* em *L. santarosai*, a mesma proteína não foi detectada no extrato utilizado; isto pode ser devido ao fato de que a sequência de proteína obtida é baseada em uma tradução conceitual, o que não necessariamente implica na proteína ser expressa e presente, bem como pelo fato de que os isolados são diferentes.

As proteínas referentes aos genes LIC10731 e LIC10645 não foram detectadas nos extratos proteicos. Isso pode ser explicado pelo provável baixo número de cópias destas proteínas nas bactérias. De fato, Malmstrom et al. (2009) identificaram estas proteínas por proteoma quantitativo em *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 (cepa virulenta), porém a abundância destas não foi determinada, pois o número de cópias ficou abaixo do limite de quantificação.

Figura 25 - Detecção da proteína OmpL1 em extratos de *Leptospira* spp.



Extratos totais de *Leptospira* spp. e a proteína recombinante OmpL1 (+, usada como controle positivo) foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membranas e incubadas com antissoro anti-OmpL1 (1:200) e então, anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5.000). A reatividade foi detectada por kit ECL. *L. interrogans* sorovares: Copenhageni (1), Canicola (2), Icterohaemorrhagiae (3) Pomona (4), *L. borgpetersenii* sorovares: Castellonis (5), Whitcombi (6), *L. kirschneri* sorovars Cynoptery (7) e Grippytyphosa (8), *L. santarosai* sorovar Shermani (9), *L. noguchii* sorovar Panama (10), *L. biflexa* sorovar Patoc (11), *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (12) e sorovar Kennewicki, cepa Pomona Fromm (13).

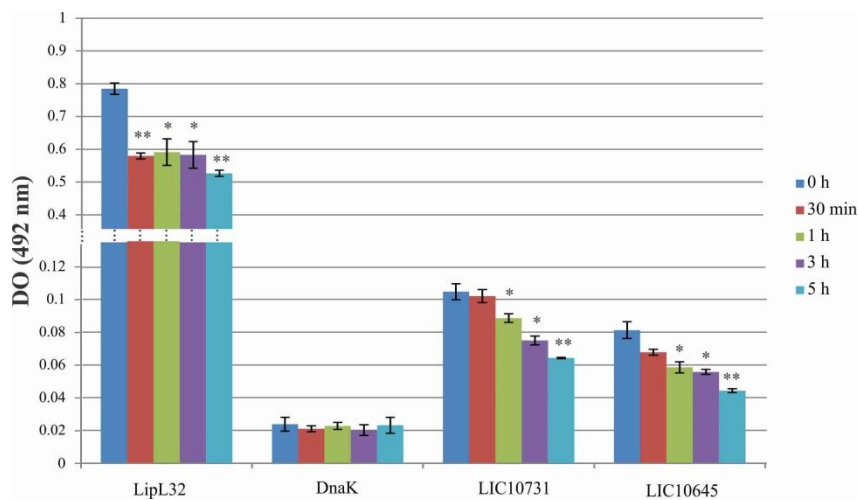
4.10 Estudo da localização celular

A proteína OmpL1 é uma proteína já bem descrita na literatura e sabidamente de membrana externa de *Leptospira* spp. (HAAKE et al., 1993, PINNE; HAAKE, 2009). Foram feitos ensaios de localização celular para se verificar se as proteínas codificadas pelos genes LIC10731 e LIC10645 estão localizadas na membrana externa da bactéria. Para tanto, foram realizados experimentos de acessibilidade por proteinase K e imunofluorescência.

A proteinase K é uma serino-protease de amplo espectro; assim sendo, quando as bactérias intactas e viáveis são incubadas com esta protease, somente as proteínas expostas são suscetíveis à clivagem proteolítica. Após incubação com proteinase K, as leptospiras foram imobilizadas em placas de ELISA e incubadas com antissoros que reconhecem as proteínas de estudo, gerados a partir da imunização de camundongos com as respectivas proteínas recombinantes.

Pode-se verificar na Figura 26 que houve uma redução do sinal das proteínas codificadas pelos genes LIC10731 e LIC10645 na superfície da leptospira, sugerindo que estas proteínas estão expostas ou parcialmente expostas na membrana externa. A proteína LipL32 foi empregada como controle positivo, em virtude de sua localização celular, sendo sabidamente uma proteína de membrana externa. A proteína DnaK (citoplasmática) foi empregada como controle negativo.

Figura 26 - Ensaio de proteinase K para estudo da localização celular das proteínas.

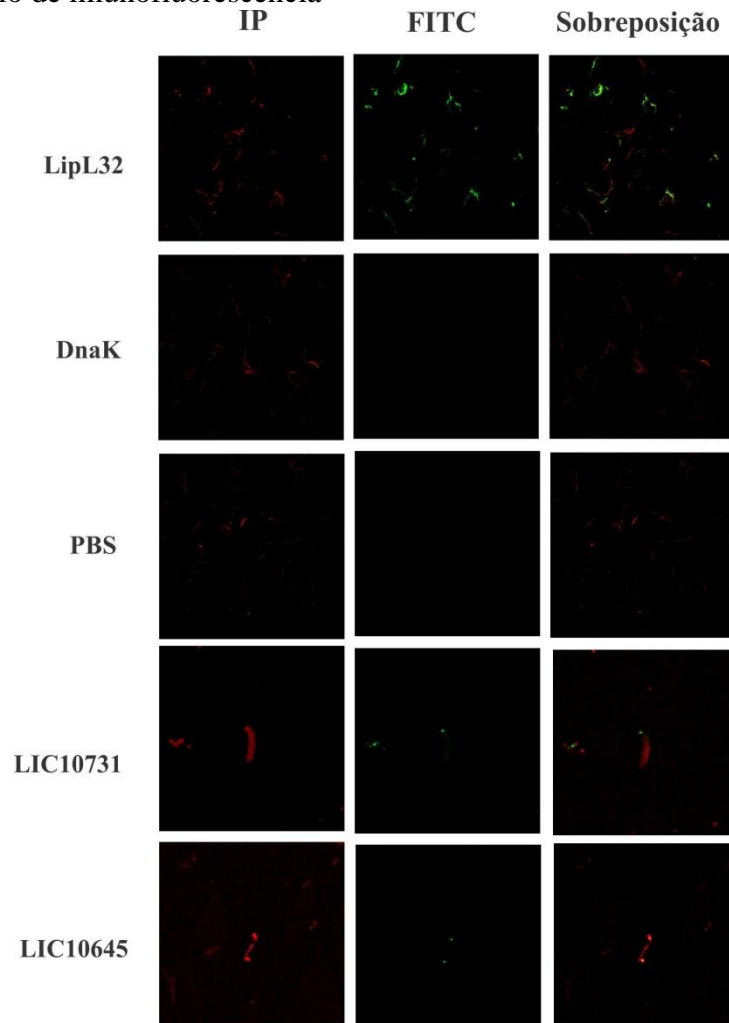


L. interrogans sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 foram tratadas com proteinase K por diferentes tempos, sendo então imobilizadas em placas de ELISA, as quais foram bloqueadas e incubadas com antissoro contra as proteínas de interesse. Então foi adicionado anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase e a reação foi revelada com substrato OPD. Para as análises estatísticas, o sinal de cada tratamento foi comparado com o tratamento 0 horas, pelo teste t-Student (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

Para corroborar os resultados de localização celular, foi realizado também um experimento de imunofluorescência, no qual as leptospiras foram primeiramente fixadas e então incubadas com antissoro contra as proteínas LIC10731 e LIC10645 (alvo de estudo), LipL32 (controle positivo, proteína exposta), DnaK (controle negativo, proteína citoplasmática), ou soro dos animais imunizados com PBS, sendo posteriormente incubadas

com iodeto de propídio (IP) e anti-IgG de camundongo conjugado com FITC. O resultado pode ser visualizado na Figura 27.

Figura 27 - Ensaio de imunofluorescência



L. interrogans sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 foram fixadas com paraformaldeído e incubadas com antissoro contra LipL32, DnaK, rLIC10731 e rLIC10645, além do soro dos animais imunizados com PBS. As bactérias foram então incubadas com iodeto de propídio (IP) e anti-IgG de camundongo conjugado com FITC. As imagens foram captadas em microscópio de imunofluorescência confocal LSM 510 META e foi utilizado aumento de 600X (FITC, excitação 488 nm, emissão 500-550 nm; Iodeto de propídio, excitação 543 nm, emissão 612-619 nm).

Pela análise dos resultados, pode-se notar que no controle LipL32 foi verificada uma alta fluorescência no verde, que denota a presença do fluoróforo FITC e indiretamente o reconhecimento da proteína LipL32 na superfície da bactéria. Os controle DnaK e PBS apresentaram apenas a fluorescência no vermelho, em virtude do fluoróforo iodeto de propídeo, que cora material genético, não sendo detectado sinal do FITC.

No tratamento com antissoro anti-rLIC10731 e rLIC10645, foi verificado um sinal de fluorescência no comprimento do verde, o que denota o possível reconhecimento das proteínas nativas na superfície da bactéria.

Estes resultados, associados às análises *in silico*, sugerem que as proteínas codificadas pelos genes LIC10731 e LIC10645 estão localizadas na membrana externa das leptospiras, o que as torna proteínas potenciais para o desenvolvimento de uma vacina e no envolvimento da patogênese da bactéria.

4.11 Adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular e soro

4.11.1 Matriz extracelular

A adesão de patógenos aos tecidos do hospedeiro é o evento inicial crítico na patogênese da maioria das infecções. Componentes específicos dos micro-organismos, chamados de adesinas, medeiam a adesão aos tecidos por meio de interações com moléculas do hospedeiro (LJUNGH; MORAN; WADSTROM, 1996).

A matriz extracelular (ECM) é um tecido biologicamente ativo composto por uma mistura complexa de macromoléculas, podendo servir não apenas como substrato para a adesão das células do hospedeiro, mais também para interação com micro-organismos patogênicos (PATTI et al., 1994). Muitos micro-organismos expressam adesinas em suas superfícies celulares que participam da ligação à matriz extracelular dos tecidos do hospedeiro.

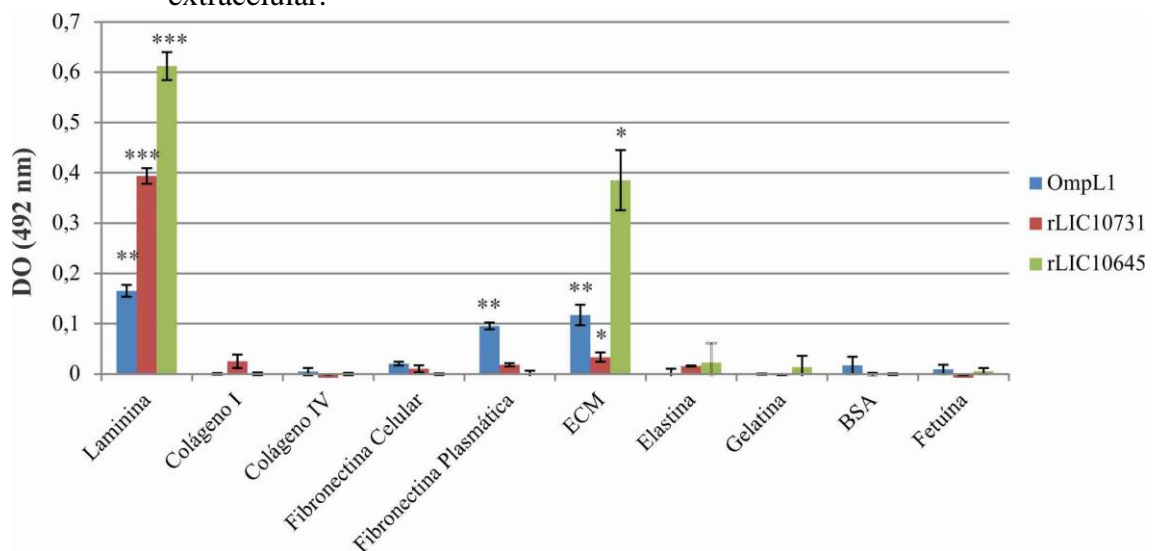
A ligação das leptospiras às células do hospedeiro e a componentes da matriz extracelular é necessária para que a bactéria consiga penetrar, disseminar-se e persistir nos tecidos.

Nosso grupo descreveu a primeira proteína de leptospira que se liga à laminina, chamada de Lsa24 (BARBOSA et al., 2006), e então muitas outras adesinas de leptospira também foram descritas e caracterizadas, como as proteínas LigA e LigB (CHOY et al., 2007), proteínas da família Len (STEVENSON et al., 2007), Lsa21 (ATZINGEN et al., 2008), LipL32 (HOKE et al., 2008) Lp95 (ATZINGEN et al., 2009), TlyC (CARVALHO et al., 2009), LipL53 (OLIVEIRA et al., 2010), OmpL37 (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010), Lsa63 (VIEIRA et al., 2010b), Lsa66 (OLIVEIRA et al, 2011), Lsa20 (MENDES et al, 2011), Lsa33 (DOMINGOS et al., 2012) e Lsa30 (SOUZA et al., 2012).

Portanto, as proteínas recombinantes foram avaliadas quanto à sua capacidade de interação com componentes da matriz extracelular. Como controle de ausência de interação, foram empregados gelatina, BSA e fetuína (componente altamente glicosilado). Pode-se observar na Figura 28 que todos os controles apresentaram baixos valores de absorbância.

A proteína OmpL1 mostrou interação significativa com laminina, fibronectina plasmática e ECM (mistura comercial de componentes da matriz extracelular). Já as proteínas rLIC10731 e rLIC10645 mostraram interação significativa com laminina e ECM.

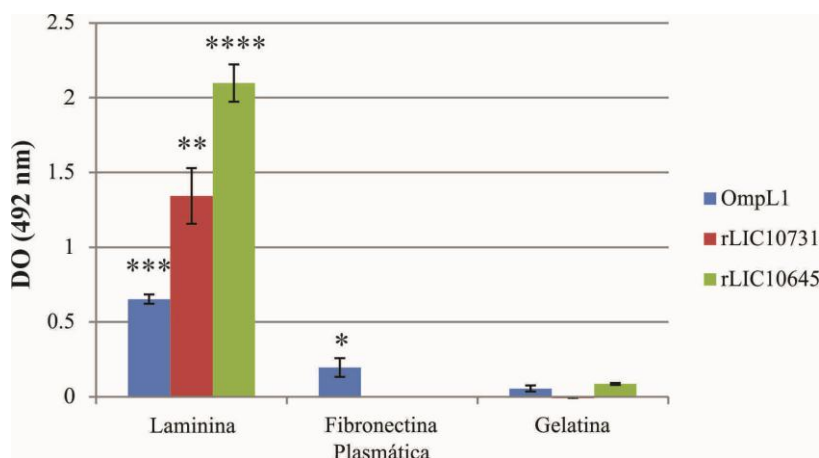
Figura 28 - Estudo de adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular.



Laminina, colágeno tipo I e IV, fibronectina celular e plasmática, ECM gel, elastina e com os controles negativos gelatina, BSA e fetuína (1 µg) foram imobilizados em placas de ELISA. Então, 1 µg da proteína recombinante foi adicionado por poço e as placas foram incubadas por 2 h a 37 °C. A detecção da ligação foi feita através da incubação com antissoro anti-proteína recombinante (1:1600 para anti-OmpL1 e 1:800 para anti-rLIC10731 e rLIC10645), seguida de incubação com anti-IgG de camundongo (1:5.000). Os dados representam o valor da média ± desvio padrão de uma triplicata, e são representativos de três experimentos independentes. Para análise estatística, a ligação das proteína a cada componente foi comparada aos controles negativos, embora o p-valor apresentado neste gráfico se refira à comparação com a gelatina, pelo teste t-Student (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001).

A adesão das proteínas recombinantes aos componentes da matriz extracelular foi confirmada por meio da utilização de anticorpo monoclonal anti-His, que reconhece especificamente as proteínas recombinantes (Figura 29).

Figura 29 - Confirmação da adesão das proteínas recombinantes a componentes da matriz extracelular pela utilização de anticorpo anti-his.



Os componentes de matriz extracelular (1 μg) com os quais se desejava corroborar a adesão às proteínas recombinantes foram imobilizados em placas de ELISA. Então, 1 μg da proteína recombinante foi adicionado por poço e as placas foram incubadas por 2 h a 37 °C. A detecção da ligação foi feita através da incubação com anticorpo monoclonal anti-his conjugado com peroxidase (1:400 para OmpL1 e 1:20.000 para anti-rLIC10731 e 1:8.000 para LIC10645). Os dados representam o valor da média \pm desvio padrão de uma triplicata, e são representativos de dois experimentos independentes. Para análise estatística, a ligação das proteínas a cada componente foi comparada com a gelatina, pelo teste t-Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$).

4.11.2 Componentes do soro

Embora a resistência ao soro apresentada por cepas patogênicas de *Leptospira* spp. tenha sido descrita há muitas décadas, os mecanismos subjacentes a esta resistência começaram a ser elucidados recentemente. Alguns patógenos desenvolveram estratégias sofisticadas para superar o sistema de defesa imune de vários hospedeiros, sobretudo mecanismos para escapar da ativação e/ou ataque lítico do complemento (BARBOSA et al., 2010; MERI et al., 2005; VERMA et al., 2006). Entre estes mecanismos, pode ser citada a aquisição de reguladores solúveis do complemento, como Fator H e C4bp (C4 binding protein).

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

Barbosa et al. (2009) demonstraram a interação das leptospiras ao regulador da via clássica do complemento, o C4bp. Desde então, foram identificados alguns ligantes deste componente na superfície das bactérias, como a LcpA (BARBOSA et al., 2010) e as proteínas Lig (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). Nosso grupo também identificou as proteínas Lsa33 (DOMINGOS et al., 2012) e Lsa30 (SOUZA et al., 2012) como receptores para C4bp.

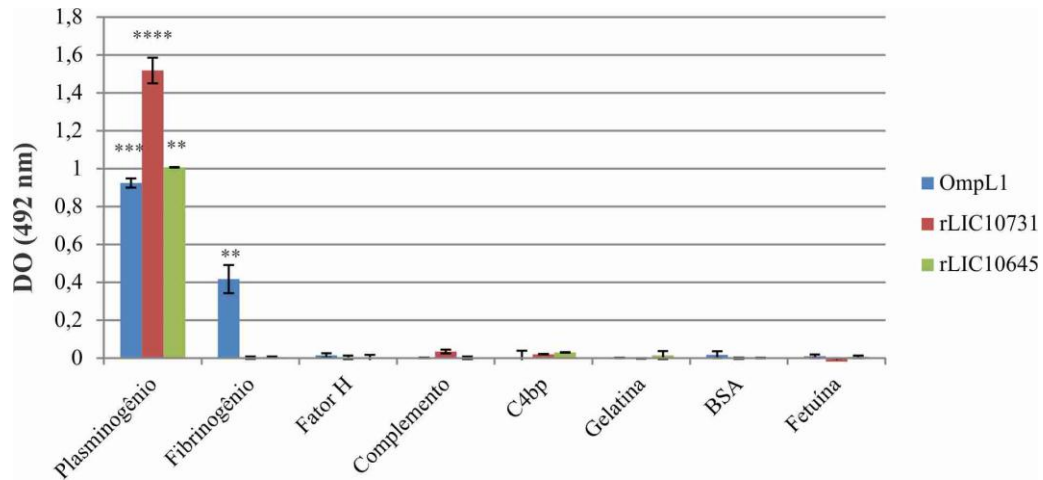
A atividade proteolítica adquirida pela subversão de proteases por patógenos, como a plasmina, demonstrou ser um importante mecanismo de patogênese em várias infecções. A plasmina é uma serino-protease do sistema fibrinolítico que tem o zimógeno (proenzima) plasminogênio como seu principal componente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

Nosso grupo demonstrou a capacidade de *L. interrogans* em se ligar ao plasminogênio (VIEIRA et al., 2009), e que esta interação se dá por meio de múltiplos ligantes (VIEIRA et al., 2010a).

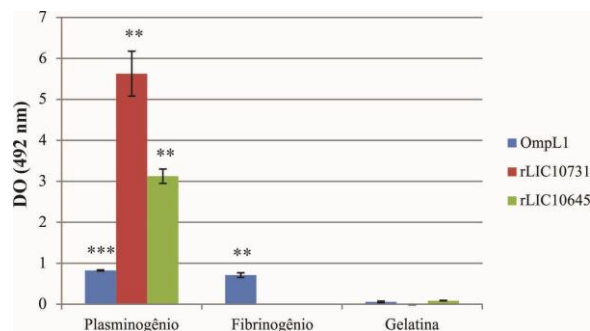
O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática de 340 kDa composta por cadeias α , β e γ ligadas por 29 pontes dissulfeto (DOOLITTLE, 1984; RIVERA et al., 2007; WEISEL, 2005). As leptospiras se ligam ao fibrinogênio (CHOY et al., 2007; PINNE; CHOY; HAAKE, 2010) e alguns receptores já foram identificados (CHOY et al., 2007; PINNE; CHOY; HAAKE, 2010).

Assim sendo, a ligação das proteínas recombinantes a componentes do soro também foi avaliada. Todas elas mostraram ligação significativa ao plasminogênio e adicionalmente, a proteína OmpL1 também se ligou ao fibrinogênio (Figura 30). Todos os controles negativos apresentaram baixos valores de absorbância.

Assim como para os componentes da matriz extracelular, a adesão das proteínas recombinantes aos componentes do soro foi corroborada por meio da utilização do anticorpo monoclonal anti-His (Figura 31).

Figura 30 - Estudo de adesão das proteínas recombinantes a componentes do soro.

Plasminogênio, fibrinogênio, fator H, complemento, C4bp e os controles negativos gelatina, BSA e fetuína (1 µg) foram imobilizados em placas de ELISA. Então, 1 µg da proteína recombinante foi adicionado por poço e as placas foram incubadas por 2 h a 37 °C. A detecção da ligação foi feita através da incubação com antissoro anti-proteína recombinante (1:1600 para anti-OmpL1 e 1:800 para anti-rLIC10731 e LIC10645), seguida de incubação com anti-IgG de camundongo (1:5.000). Os dados representam o valor da média ± desvio padrão de uma triplicata, e são representativos de três experimentos independentes. Para análise estatística, a ligação das proteína a cada componente foi comparada aos controles negativos, embora o p-valor apresentado neste gráfico se refira à comparação com a gelatina, pelo teste t-Student (**p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001).

Figura 31 - Confirmação da adesão das proteínas recombinantes a componentes do soro pela utilização de anticorpo anti-his.

Os componentes de soro (1 µg) com os quais se desejava corroborar a adesão às proteínas recombinantes foram imobilizados em placas de ELISA. Então, 1 µg da proteína recombinante foi adicionado por poço e as placas foram incubadas por 2 h a 37 °C. A detecção da ligação foi feita através da incubação com anticorpo monoclonal anti-his conjugado com peroxidase (1:400 para OmpL1 e 1:20.000 para anti-rLIC10731 e 1:8.000 para LIC10645). Os dados representam o valor da média ± desvio padrão de uma triplicata, e são representativos de dois experimentos independentes. Para análise estatística, a ligação das proteína a cada componente foi comparada com a gelatina, pelo teste t-Student (**p<0,01 e ***p<0,001).

4.12 Efeito dos anticorpos e desnaturação térmica na ligação das proteínas recombinantes aos componentes

Foi avaliada a possível inibição da interação entre as proteínas recombinantes e seus ligantes por meio da incubação das proteínas com antissoro gerado contra cada uma destas. O antissoro apresentou um efeito inibitório e dose-dependente na interação entre as proteínas e os componentes, o que sugere que alguns epítomos antigênicos contidos nestas proteínas recombinantes estão envolvidos na interação com os componentes ou localizados próximos das regiões de interação (Figura 32).

Como controle, as proteínas recombinantes foram incubadas também com soro pré-imune, nas mesmas concentrações empregadas para o antissoro anti-proteína recombinante. Apenas uma pequena inibição foi observada nestas situações, possivelmente devido à interferência de alguns componentes do soro.

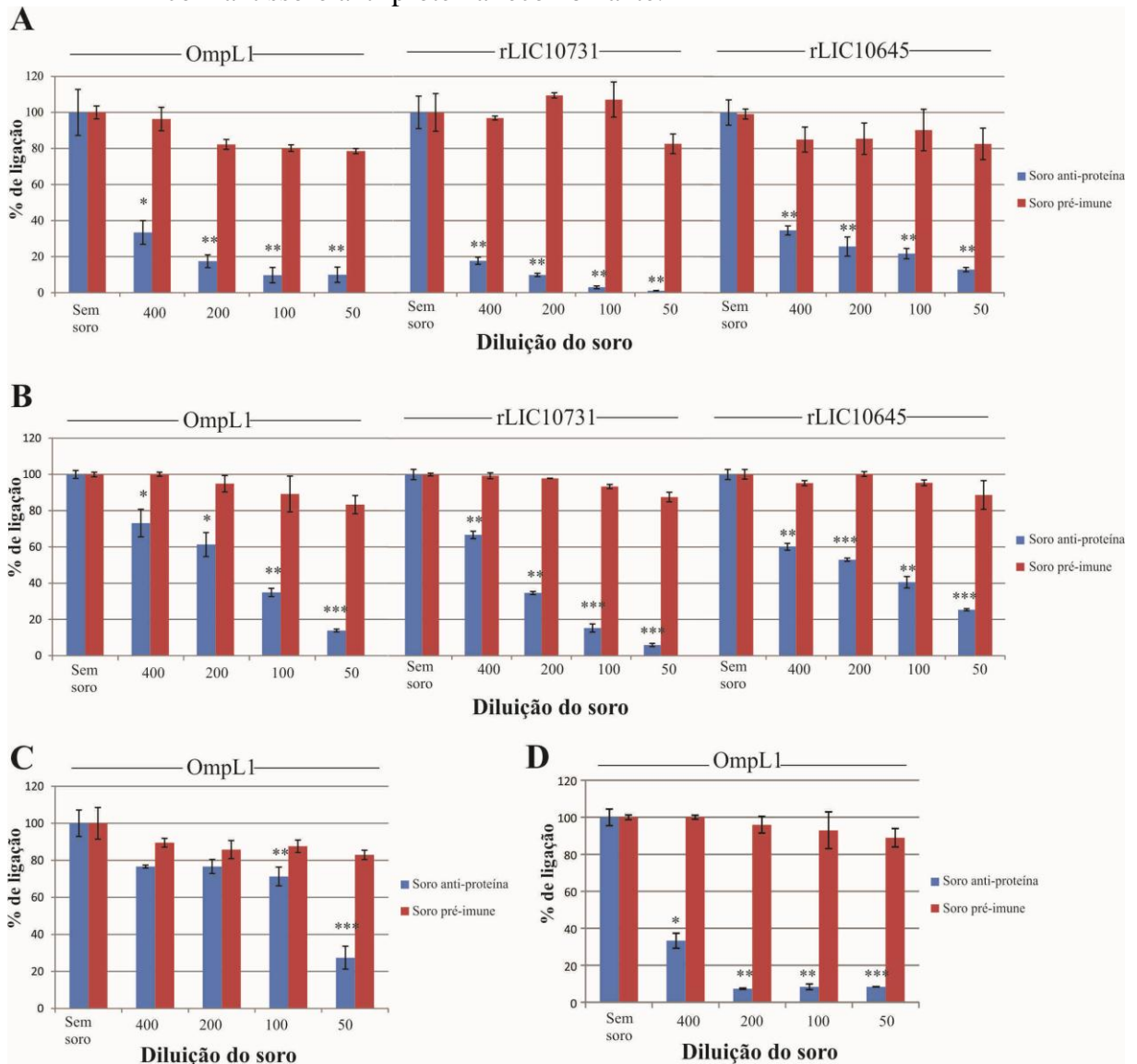
Ademais, foi avaliada a importância da estrutura tridimensional nas proteínas recombinantes na interação com os componentes. Para tal, as proteínas recombinantes foram previamente fervidas para que ocorresse a desnaturação, e então incubadas com o componente de interesse, para se verificar a ligação (Figura 33).

Para a proteína OmpL1, houve uma redução expressiva e significativa na interação com todos os componentes utilizados, o que denota que a estrutura terciária da proteína é importante para suas propriedades de interação com componentes da matriz extracelular e soro, ou seja, os domínios de ligação são preferencialmente conformacionais.

Proteína rLIC10731, foi verificado uma redução significativa, porém pouco expressiva, na interação desta proteína com o plasminogênio, sugerindo que a interação entre eles se dá principalmente por domínios lineares. Em contraponto, a interação de rLIC10731 com laminina não sofreu alteração, o que denota a predominância de domínios lineares na interação da proteína recombinante com a macromolécula.

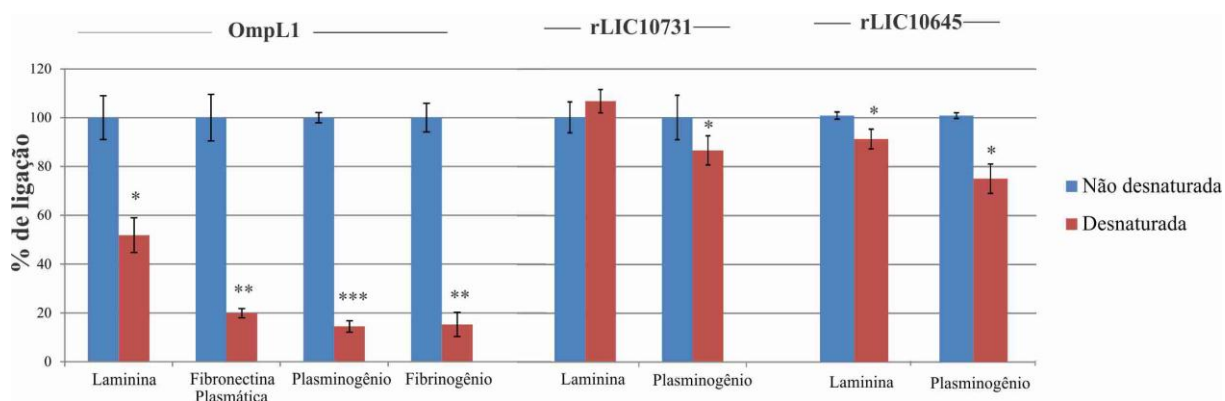
Para a proteína rLIC10645, houve uma redução significativa na interação tanto com laminina quanto plasminogênio, porém pouco expressiva, sugerindo que os domínios envolvidos na interação com estes componentes são preferencialmente lineares, ou seja, independentes da conformação da proteína.

Figura 32 - Inibição da adesão das proteínas recombinantes aos componentes pela incubação com antissoro anti-proteína recombinante.



As proteínas recombinantes foram incubadas com diferentes diluições do antissoro ou soro pré-imune (controle negativo) e então adicionadas à placa de ELISA para interação com os componentes previamente imobilizados, laminina (A), plasminogênio (B), fibronectina plasmática (C) e fibrinogênio (D). A detecção da ligação foi feita através da incubação com anticorpo anti-His conjugado com peroxidase (1:400 para OmpL1, 1:20.000 para rLIC10731 e 1:8.000 para rLIC10645). As reduções primeiramente foram comparadas entre cada diluição e seu respectivo controle negativo, e sendo detectada diferença significativa ($p < 0,05$), as médias da ligação foram comparadas com a situação onde as proteínas recombinantes não foram incubadas com antissoro, considerada o máximo de ligação, pelo teste t-Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Figura 33 - Inibição da adesão das proteínas recombinantes aos componentes pela desnaturação térmica.



As proteínas recombinantes OmpL1, rLIC10731 e rLIC10645 foram incubadas a 100 °C por 10 minutos e então adicionadas à placa de ELISA para interação com os componentes previamente imobilizados. A detecção da ligação foi feita com auxílio de antissoro gerado contra cada proteína recombinante. As médias da ligação foram comparadas com a situação onde as recombinantes não foram aquecidas, considerada o máximo de ligação, pelo teste t-Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

FONTE: Fernandes (2012).

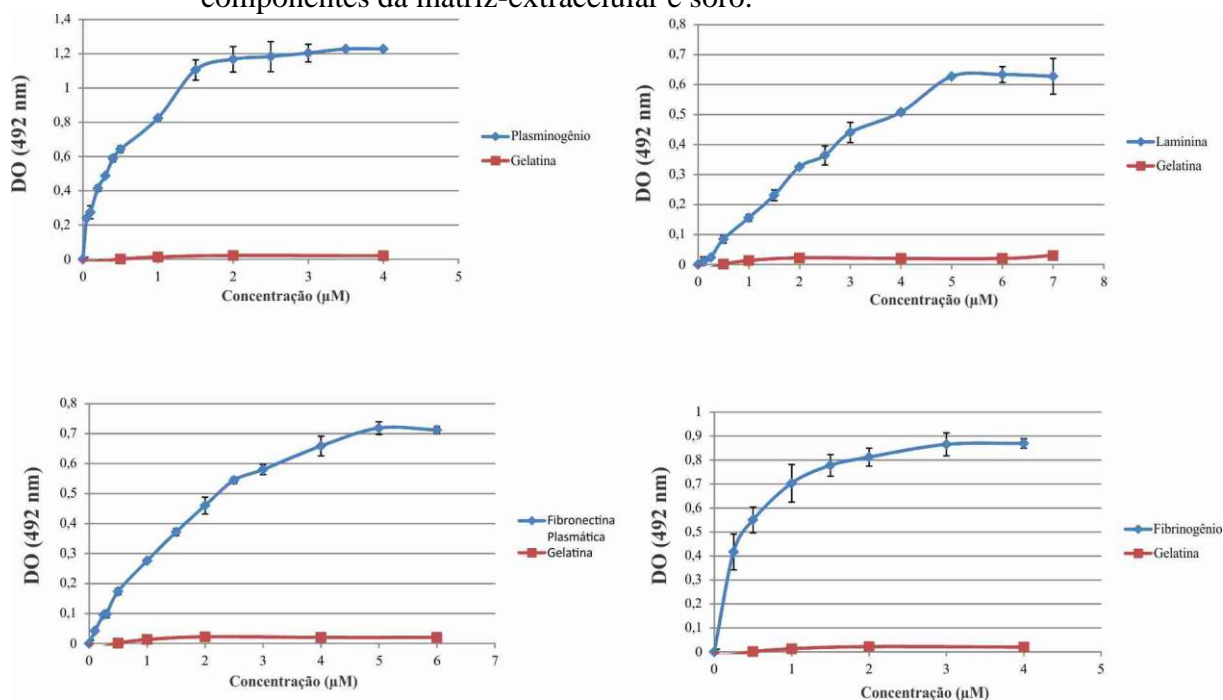
4.13 Curvas de dose-resposta

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

Pode-se observar na Figura 34 que a proteína OmpL1 apresentou ligação dose-dependente e saturável a todos componentes com os quais apresentou ligação significativa, ou seja, laminina, fibronectina plasmática, plasminogênio e fibrinogênio.

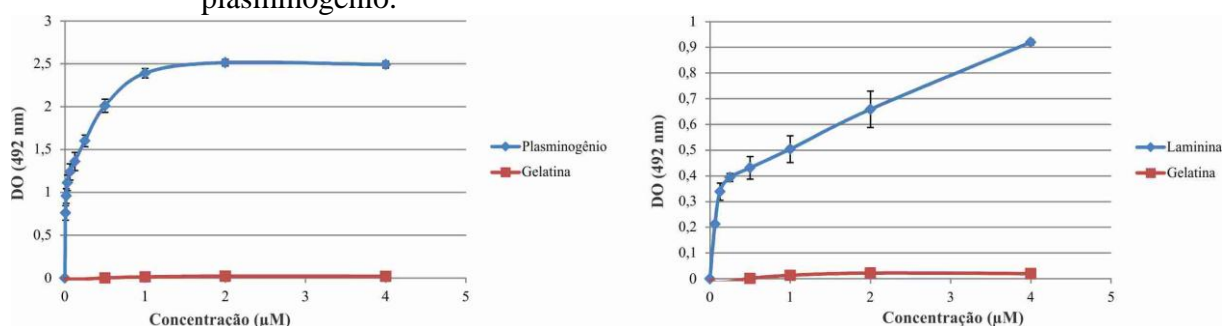
A proteína rLIC10731 mostrou ligação dose-dependente a laminina e plasminogênio, mas apenas a saturação foi obtida para o plasminogênio (Figura 35). A proteína rLIC10645 apresentou ligação dose-dependente e saturável a todos componentes com os quais demonstrou ligação, ou seja, laminina e plasminogênio (Figura 36). Os valores da constante de dissociação (K_D) estão apresentados na Tabela 3, em unidade nM.

Figura 34 - Curvas de dose-resposta da ligação da proteína recombinante OmpL1 aos componentes da matriz-extracelular e soro.



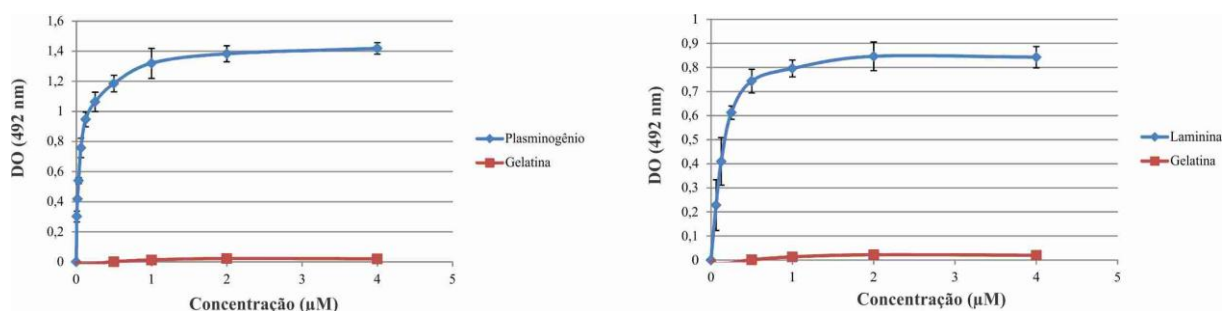
Experimentos de dose-resposta da proteína recombinante OmpL1 ao plasminogênio (A), laminina (B), fibronectina plasmática (C) e fibrinogênio (D). Os componentes imobilizados foram incubados com concentrações crescentes da proteína recombinante; cada ponto foi feito em triplicata e expresso como a média \pm o desvio padrão. A gelatina foi incluída como um controle negativo. A detecção da ligação foi feita por meio da incubação com antissoro anti-proteína (1:1.600) seguida de incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5.000).

Figura 35 - Curvas de dose-resposta da ligação das proteínas rLIC10731 à laminina e plasminogênio.



Experimentos de dose-resposta da proteína rLIC10731 ao plasminogênio (A) e laminina (B). Os componentes imobilizados foram incubados com concentrações crescentes da proteína recombinante; cada ponto foi feito em triplicata e expresso como a média \pm o desvio padrão. A gelatina foi incluída como um controle negativo. A detecção da ligação foi feita por meio da incubação com antissoro anti-proteína (1:800) seguida de incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5.000).

Figura 36 - Curvas de dose-resposta da ligação das proteínas rLIC10645 à laminina e plasminogênio.



Experimentos de dose-resposta da proteína rLIC10645 ao plasminogênio (A) e laminina (B). Os componentes imobilizados foram incubados com concentrações crescentes da proteína recombinante; cada ponto foi feito em triplicata e expresso como a média \pm o desvio padrão. A gelatina foi incluída como um controle negativo. A detecção da ligação foi feita por meio da incubação com antissoro anti-proteína (1:800) seguida de incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5.000).

Tabela 3 - Constantes de dissociação apresentadas pelas proteínas recombinantes

	Laminina	Plasminogênio	Fibronectina Plasmática	Fibrinogênio
OmpL1	2099,91 \pm 871,03	368,63 \pm 121,23	1239,22 \pm 506,85	222,58 \pm 63,06
rLIC10731	250,38*	36,80 \pm 20,39	-----	-----
rLIC10645	108,21 \pm 43,28	53,56 \pm 18,49	-----	-----

Nota: Os valores contidos nessa tabela estão expressos em nM; * refere-se a constante de dissociação calculada a partir de regressão linear.

Quanto aos componentes da matriz extracelular, OmpL1, ao contrário de algumas proteínas que são apenas ligantes de laminina, como Lsa24 (BARBOSA et al., 2006) e Lsa20 (MENDES et al., 2011), mostrou um espectro maior de ligantes, o que também ocorre para as proteínas, como Lsa21 (ATZINGEN et al., 2008), LipL32 (HOKE et al., 2008), TlyC (CARVALHO et al., 2009), OmpL37 (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010), Lsa66 (OLIVEIRA et al., 2011) e Lsa30 (SOUZA et al., 2012). Os valores de K_D apresentados pela OmpL1 em relação à laminina e fibronectina plasmática são altos em relação a outras adesinas já publicadas, o que denota baixa especificidade de ligação. Porém, a cinética de dose-dependência de cada ligante à proteína OmpL1 é específica e uma ligação saturável aos componentes imobilizados foi observada, satisfazendo as propriedades de uma interação típica receptor-ligante.

A baixa afinidade de ligação entre OmpL1 e seus ligantes pode ser compensada pelo elevado número de cópias desta proteína na superfície de *L. interrogans* (MALMSTROM et

al., 2009), o qual foi demonstrado aumentar ainda mais após 7 dias de tratamento das bactérias com soro (SCHMIDT et al., 2011).

A proteína rLIC10645 possui alta afinidade à laminina, o que é denotado pelo baixo valor da constante de dissociação, bem próximo a de outras proteínas publicadas, como por exemplo Lsa66 (OLIVEIRA et al., 2011). Já no que tange a proteína rLIC10731, o valor da constante de dissociação não pôde ser calculado diretamente, visto que não foi atingido o máximo de ligação. A inviabilidade de se avançar nas concentrações para esta proteína se deve ao fato de que ela apresenta um baixo rendimento na purificação e mostra instabilidade quando submetidas a métodos de concentração, sofrendo degradação e/ou precipitação. Assim, foi utilizada uma regressão linear baseada em cinética de Michaelis-Menten para estimar a constante de dissociação.

A afinidade da proteína OmpL1 ao plasminogênio é baixa em comparação a algumas proteínas ligantes de plasminogênio (VIEIRA et al., 2010a), mas está na mesma ordem de magnitude que a proteína Lsa20 (MENDES et al., 2011). Já as proteínas rLIC10731 e rLIC10645 apresentam alta afinidade ao plasminogênio, com valores de K_D bem próximos aos obtidos para outros receptores deste componente já caracterizados (VIEIRA et al., 2010a). O valor de K_D entre OmpL1 e fibrinogênio é intermediário, porém está bem pertinentes com outras proteínas de leptospira ligantes de fibrinogênio, como OmpL37 (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010) e LigB (LIN et al., 2011).

4.14 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes à laminina

Laminina é uma proteína bastante grande e flexível, composta de três cadeias polipeptídicas arranjadas assimetricamente por meio de pontes dissulfeto. Uma característica típica da laminina é seu alto teor de carboidratos, normalmente entre 13 e 15% (FUJIWARA et al., 1988).

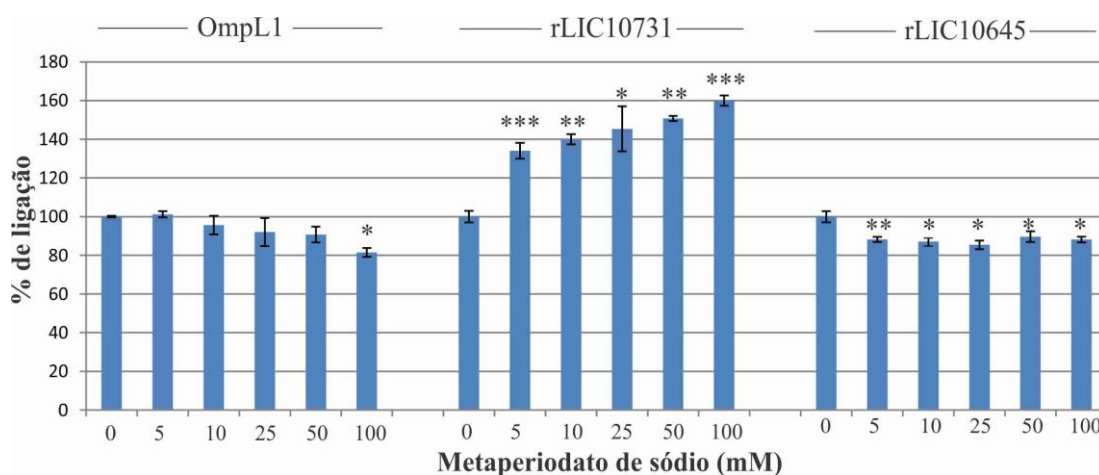
Foi determinada a importância dos resíduos de carboidratos contidos na laminina na interação desta com as proteínas recombinantes, por meio da oxidação dos componentes glicídicos contidos na laminina.

Para as proteínas rLIC10645 e OmpL1, a oxidação dos resíduos de carboidratos da laminina provocou apenas uma ligeira redução na interação com este componente (Figura 37).

Em relação à proteína rLIC10731, foi verificado um aumento na ligação à laminina, o que pode ser explicado, possivelmente, por uma mudança estrutural na molécula de laminina, o que pode ter exposto novos sítios de ligação à proteína rLIC10731. Embora

normalmente as concentrações de metaperiodato de sódio empregadas causem apenas oxidação dos carboidratos periféricos ao invés de alteração na estrutura desta macromolécula (WOODWARD; YOUNG JR; BLOODGOOD, 1985), este efeito não pode ser descartado.

Figura 37 - Participação dos resíduos de açúcar na interação entre as proteínas recombinantes e a laminina.



Laminina (1 µg/poço) foi incubada com concentrações crescentes de metaperiodato de sódio, para oxidação dos resíduos de açúcar. Em seguida, foi adicionada a proteína recombinante (1 µg) e a interação prosseguiu por 2 h. A detecção da ligação foi feita através de antissoro gerado contra cada recombinante. Para análise estatística, os valores de porcentagem de ligação para cada concentração de metaperiodato foram comparados com a situação na qual a laminina não foi incubada com o agente oxidante, o que define a ligação máxima, pelo teste t-Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

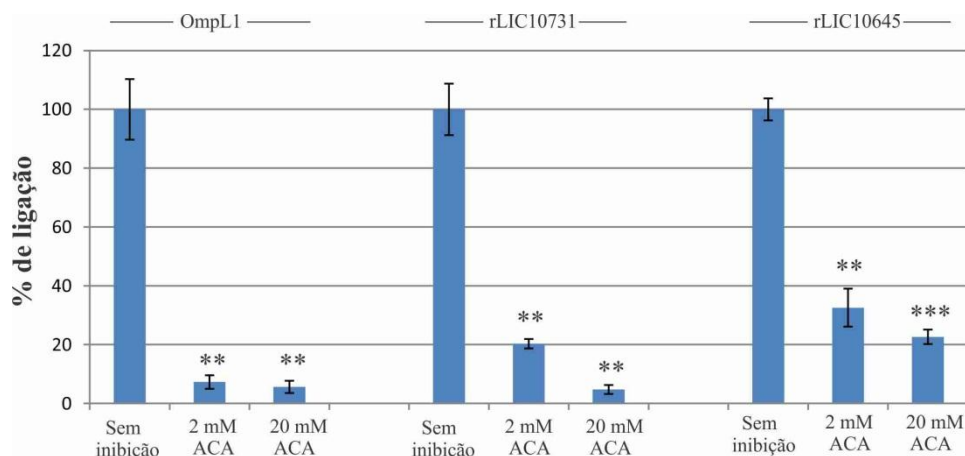
4.15 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio

Já está bem estabelecido que os domínio *kringle* do plasminogênio frequentemente medeiam a interação com resíduos de lisina em receptores de diversas bactérias (LAHTEENMAKI; KUUSELA; KORHONEN, 2001). Estes domínios também participam da ligação do plasminogênio à *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1-130, uma vez que o análogo de lisina, ácido aminocapróico (ACA), quase inibiu totalmente a interação entre a bactéria e o plasminogênio (VIEIRA et al., 2009). Baseado nessas constatações, a participação dos resíduos de lisina na ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio foi avaliada.

A interação entre as proteínas recombinantes e o plasminogênio foi bastante reduzida pela adição do análogo de lisina (Figura 38), sugerindo fortemente que a ligação entre estes se

deve principalmente pela interação entre os domínios *kringle* do plasminogênio e os resíduos de lisina presentes nas proteínas.

Figura 38 - Influência dos resíduos de lisina na ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio.



Plasminogênio (1µg/poço) foi imobilizado, e então foram adicionadas as proteínas recombinantes (1µg/poço), co-incubadas com ácido aminocapróico (ACA, 2 e 20 mM). Após interação, a detecção da ligação das proteínas ao plasminogênio foi feita por meio da utilização de antissoro específico contra cada proteína, seguida de incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. A verificação da significância da redução foi feita por meio do teste t-Student, em comparação com o tratamento sem inibição (**p<0,01 e ***p<0,001).

4.16 Conversão do plasminogênio ligado às proteínas recombinantes à plasmina

O plasminogênio é o precursor da serino-protease fibrinolítica plasmina. O plasminogênio circulante, o qual contém 5 domínios *kringle* e um domínio de serino-protease, adota uma conformação fechada, resistente à ativação. Os domínios *kringle* medeiam a interação do plasminogênio a seus receptores, e assim o plasminogênio adota uma conformação mais aberta, podendo então ser clivado e convertido à plasmina por ativadores de plasminogênio (LAW et al., 2012).

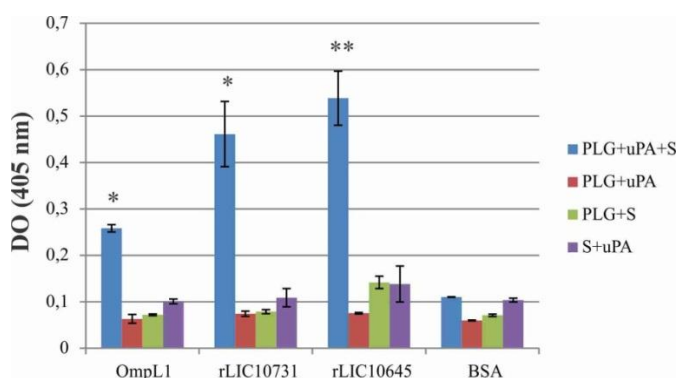
Para verificar se o plasminogênio ligado às proteínas recombinantes é passível de ser convertido à plasmina, conforme já descrito para outras proteínas (DOMINGOS et al., 2012; MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; SOUZA et al., 2012; VERMA et al., 2010; VIEIRA et al., 2010a), as proteínas recombinantes foram imobilizadas em placas de ELISA, e então incubadas com plasminogênio.

Subsequentemente, foram adicionados o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPa) e o substrato cromogênico específico. A reação foi mantida por 16 horas e a atividade da plasmina foi medida indiretamente pela geração de cor, resultante da degradação do substrato cromogênico, por meio da leitura de absorbância no comprimento de onda de 405 nm.

Pelos resultados obtidos (Figura 39) pode-se concluir que o plasminogênio ligado a todas as proteínas recombinantes é passível de ser convertido a sua forma enzimaticamente ativa, a plasmina. Os controles negativos, nos quais um dos componentes do sistema proteolítico foi omitido, não apresentaram atividade enzimática.

Portanto, pode ser que estas proteínas tenham um papel na patogênese e na invasão da bactéria nos tecidos.

Figura 39 - Geração de plasmina pela ativação do plasminogênio ligado às proteínas recombinantes.



A geração de plasmina pelo plasminogênio ligado às proteínas recombinantes foi avaliada indiretamente, por ELISA; As proteínas imobilizadas (1µg/poço) receberam os seguintes tratamentos: plasminogênio+uPA+Substrato específico, ou controles nos quais um dos componentes foi omitido. BSA foi empregado como controle negativo. As barras representam o valor médio de absorbância no comprimento de onda de 405 nm, como uma medida da clivagem do substrato, \pm o desvio padrão de três replicatas e são representativas de dois experimentos independentes. A significância estatística é dada em relação ao BSA, por teste t-Student (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

4.17 Inibição da formação do coágulo de fibrina

A ativação da protrombina em trombina pela cascata de coagulação converte o fibrinogênio solúvel em uma rede tridimensional de fibrina insolúvel, formando um coágulo (DOOLITTLE, 1984; WEISEL, 2005). Muitos patógenos conseguem interferir na cascata de

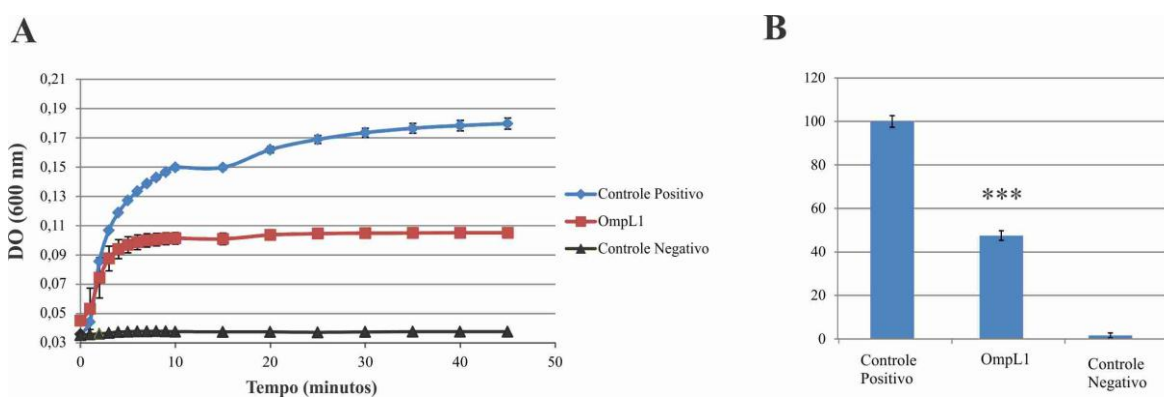
coagulação e trombose se ligando ao fibrinogênio (CHAVAKIS et al., 2005; RIVERA et al., 2007).

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

Foi verificado o efeito da ligação da proteína OmpL1 ao fibrinogênio em relação a formação do coágulo de fibrina. Conforme apresentado na Figura 40, a proteína OmpL1 ligada ao fibrinogênio é capaz de reduzir a formação do coágulo de fibrina, apresentando uma redução significativa quando se compara a porcentagem do coágulo na região de saturação.

Os dados sugerem que a proteína OmpL1 possa ter uma participação no aparecimento do quadro hemorrágico durante a leptospirose.

Figura 40 - Inibição do coágulo de fibrina pela proteína recombinante OmpL1.



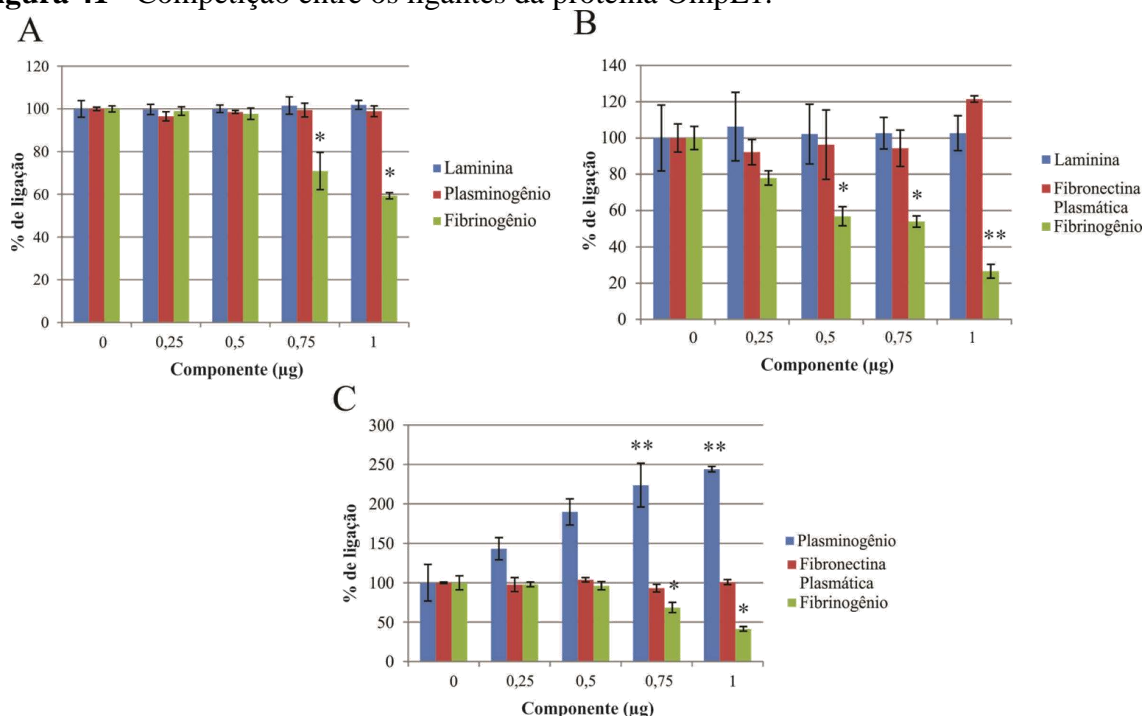
Fibrinogênio (1mg/mL) foi incubado com a proteína OmpL1 (3 μ M) por 2 h, a 37 $^{\circ}$ C, e então foram adicionados 90 μ L da solução a cada poço de uma placa de ELISA, mais 10 μ L de trombina (10 U/mL). Foram realizados dois experimentos independentes, realizados em triplicata e o resultado apresentado se refere a um experimento representativo. O controle positivo se refere ao fibrinogênio mais trombina, e no controle negativo esta última foi omitida. A comparação entre as porcentagens do coágulo foi feita pelo teste t-Student (***) $p < 0,001$). (A) refere-se à cinética de formação do coágulo de fibrina e (B) refere-se a porcentagem de formação do coágulo ao final de 45 minutos, em relação ao controle positivo.

4.18 Interferência na ligação entre os componentes

A proteína OmpL1 apresentou ligação significativa à laminina, fibronectina plasmática, plasminogênio e fibrinogênio. Assim sendo, foi verificada a interferência entre estes componentes na ligação à proteína recombinante.

Pode-se verificar que laminina, fibronectina plasmática e plasminogênio apresentam sítios de ligação distintos (Figura 41) uma vez que a adição de massas crescentes de um componente não interferiu na ligação do outro à proteína recombinante imobilizada. Já o fibrinogênio mostrou interferência na ligação dos outros componentes à proteína recombinante OmpL1, o que sugere que, uma vez ligado à proteína, o fibrinogênio, por ser uma macromolécula bastante grande, interfira na acessibilidade dos outros componentes à proteína recombinante.

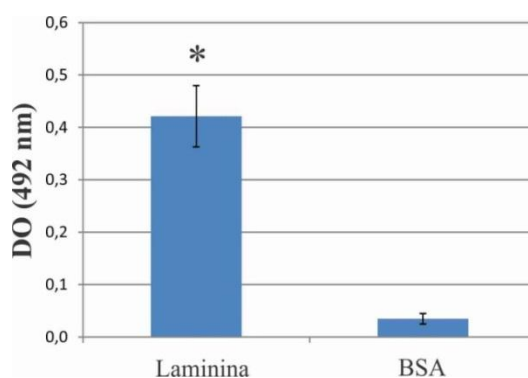
Figura 41 - Competição entre os ligantes da proteína OmpL1.



A proteína recombinante foi imobilizada (1 µg/poço) e incubada com um componente fixo (1 µg em 100 µL) acrescido de massas crescentes de outro componente, com o qual se deseja verificar a competição. Em (A) tem-se o experimento feito com massa fixa de fibronectina plasmática, (B) plasminogênio e (C) laminina. A detecção foi feita com o uso de anticorpo contra o componente fixo, utilizando uma diluição que apresentou OD492 nm igual a 1 em experimentos de titulação. A significância estatística foi calculada pelo teste t-Student por meio da comparação com o tratamento apenas contendo o componente com concentração fixa (* $p < 0,1$ e ** $p < 0,01$).

Pode-se verificar que a adição de massas crescentes de plasminogênio a uma massa fixa de laminina (1 μg em 100 μL de solução) ocasionou um aumento da ligação desta a proteína OmpL1. A possível explicação para este fenômeno se deve ao fato de que, não havendo interferência entre esses componentes, tanto laminina quanto plasminogênio se ligam à proteína recombinante, e adicionalmente, laminina excedente também se liga ao plasminogênio ligado à recombinante, contribuindo para o aumento de sinal. De fato, já está bem estabelecida na literatura a interação entre plasminogênio e laminina (SALONEN; ZITTING; VAHERI, 1984). Foi feito um ensaio de adesão entre laminina e plasminogênio, para confirmar os resultados (Figura 42).

Figura 42 - Verificação da interação entre laminina e plasminogênio.

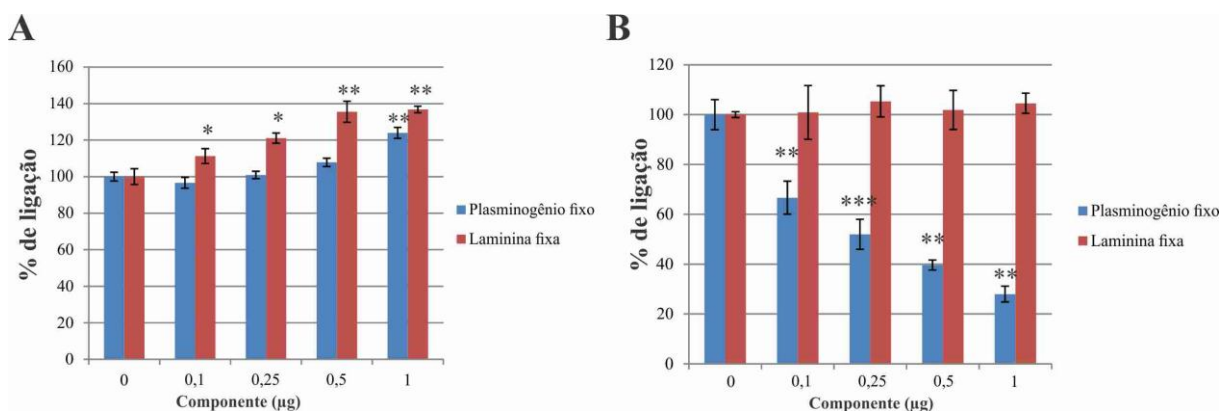


Foi verificada a interação do plasminogênio (1 μg em 100 μL) com a laminina imobilizada (1 μg). A interação foi feita por 2 h e a detecção da ligação foi feita com incubação com anticorpo anti-plasminogênio (1:400) seguida de incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5.000). BSA foi empregado como controle negativo para comparação estatística pelo test t-Student (* $p < 0,05$).

Já as proteínas rLIC10731 e rLIC10645 apresentaram ligação apenas com laminina e plasminogênio. Para rLIC10731, não foi verificada interferência entre os componentes, o que sugere que eles possuem sítios distintos de ligação. Um efeito similar ao observado para OmpL1 também ocorreu, ou seja, foi verificado um pequeno aumento na ligação em virtude da interação entre laminina e plasminogênio (Figura 43).

Para a proteína rLIC10645, foi verificada interferência apenas quando foi adicionada massa crescente de laminina, o que acarretou em uma diminuição da ligação do plasminogênio à proteína recombinantes imobilizada (Figura 43). Possivelmente os sítios de ligação são distintos, porém próximos, e então a laminina exerça um bloqueio estérico sobre o plasminogênio quando ligada, por ser uma macromolécula maior.

Figura 43 - Competição entre os ligante das proteínas rLIC10731 e rLIC10645.



As proteínas rLIC10731 (**A**) ou rLIC10645 (**B**) foram imobilizadas (1 µg/poço) e incubada com um componente fixo (1 µg em 100 µL) acrescido de massas crescentes de outro componente, com o qual se deseja verificar a competição. A detecção foi feito com o uso de anticorpo contra o componente fixo, utilizando uma diluição que apresentou OD492 nm igual a 1 em experimentos de titulação. A significância estatística foi calculada pelo teste t-Student por meio da comparação com o tratamento apenas contendo o componente com concentração fixa (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

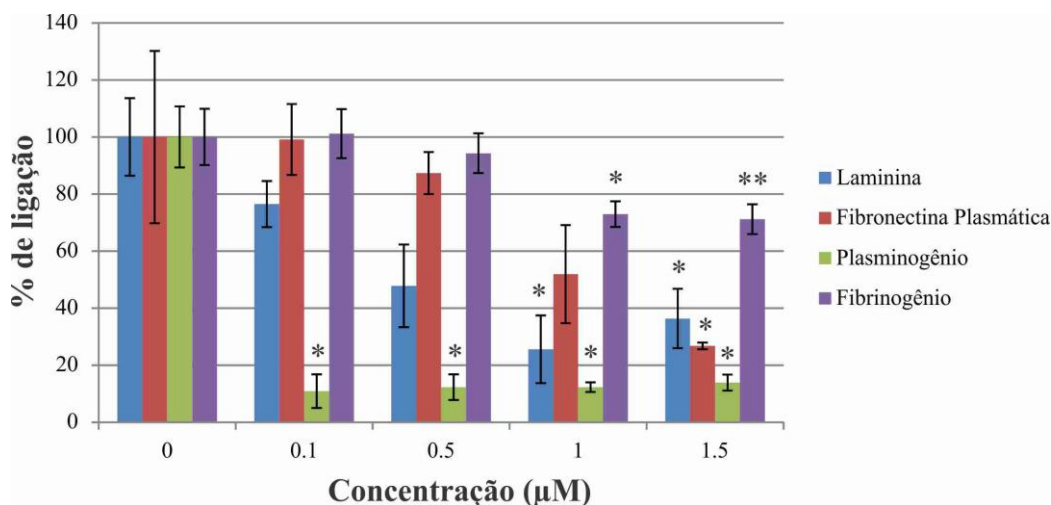
4.19 Inibição da ligação das leptospiros vivas aos componentes

Já foi descrito na literatura que várias proteínas recombinantes de *Leptospira* spp. (BARBOSA et al., 2006; DOMINGOS et al., 2012; MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011) exibem um efeito inibitório na ligação das leptospiros aos componentes da matriz extracelular e soro.

Portanto, foram feitos experimentos similares para avaliar o efeito inibitório das proteínas OmpL1, rLIC10731 e rLIC10645 na ligação das leptospiros vivas aos componentes. Os componentes imobilizados em placas de ELISA foram incubados com concentrações crescentes das proteínas recombinantes, e subsequentemente com as leptospiros.

A proteína OmpL1 foi capaz de inibir significativamente a aderência das leptospiros à laminina (a partir de 1 µM), fibronectina plasmática (a partir de 1,5 µM), plasminogênio (a partir de 0,1 µM) e fibrinogênio (a partir de 1 µM) (Figura 44). Esta redução foi bastante expressiva para alguns componentes, o que pode ser explicado pelo elevado número de cópias dessa proteína na superfície das leptospiros (MALMSTROM et al., 2009; SCHMIDT et al., 2011).

Figura 44 - Inibição da ligação das leptospiiras vivas aos componentes pela ação da proteína recombinante OmpL1.

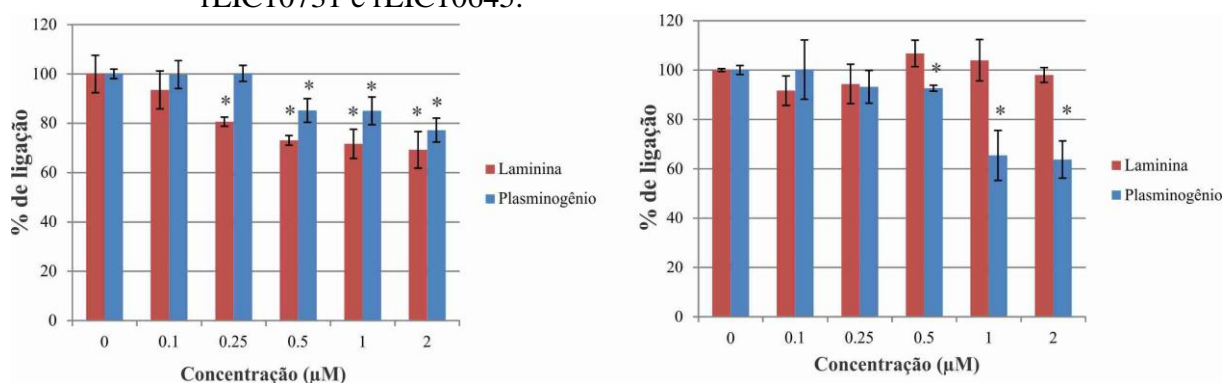


1 μg de cada componente foi imobilizado por poço de uma placa de ELISA, e a estes foram adicionadas concentrações crescentes da proteína recombinante OmpL1. Após incubação por 2 horas a 37 °C, as placas foram novamente lavadas e incubadas com 100 μL de uma solução 10⁸ leptospiiras/mL, as quais foram incubadas por 2 horas a 37 °C. A detecção das leptospiiras ligadas foi feita por meio da incubação com antissoro anti-LipL32 (1:2.000) e em seguida por incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5.000); a reação foi revelada com utilização do substrato OPD. A significância das reduções foi feita pelo teste t-Student (*p<0,05 e **p<0,01).

A proteína rLIC10731 foi capaz de inibir significativamente a adesão das leptospiiras à laminina (a partir de 0,25 μM) e ao plasminogênio (a partir de 0,5 μM) (Figura 45). A redução foi modesta, o que pode ser explicado pelo baixo número de cópias desta proteína na bactéria, bem como pela redundância funcional apresentada pela leptospira, a qual possui uma série de receptores para laminina e plasminogênio.

Já a incubação com a proteína rLIC10645 apenas reduziu a interação das leptospiiras ao plasminogênio (a partir de 0,5 μM), não sendo observado este efeito para a interação das bactérias com a laminina (Figura 45). Isto sugere que a proteína LIC10645 na superfície da bactéria tenha pouca participação efetiva na interação com a laminina, ou ainda que a proteína recombinante e a nativa possuam avidéz diferente de ligação à laminina. Este efeito de não inibição da ligação das leptospiiras também foi observado por Pinne, Choy e Haake (2010), os quais verificaram que a proteína recombinante OmpL37, que se liga à elastina, não foi capaz de inibir a adesão das leptospiiras a este mesmo componente.

Figura 45 - Inibição da ligação das leptospiiras vivas aos componentes pela ação das proteínas rLIC10731 e rLIC10645.



1 μg de cada componente foi imobilizado por poço de uma placa de ELISA, e a estes foram adicionadas concentrações crescentes das proteínas recombinantes rLIC10731 (A) e rLIC10645 (B). Após incubação por 2 horas a 37 °C, as placas foram novamente lavadas e incubadas com 100 μL de uma solução 10⁸ leptospiiras/mL, as quais foram incubadas por 2 horas a 37 °C. A detecção das leptospiiras ligadas foi feita por meio da incubação com antissoro anti-LipL32 (1:2.000) e em seguida por incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5.000); a reação foi revelada com utilização do substrato OPD. A significância das reduções foi feita pelo teste t-Student (*p<0,05).

4.20 Ensaio de imunoproteção pela imunização com a proteína rLIC10731

As vacinas humanas licenciadas contra leptospirose são baseadas em bactérias mortas, similares às vacinas animais (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999; LEVETT et al., 2001). Porém estas vacinas não induzem memória nem proteção cruzada, uma vez que a resposta imune é praticamente toda direcionada contra os LPS de leptospiiras, os quais são bastante heterogêneos, sendo considerados os determinantes antigênicos (FAINE et al., 1999).

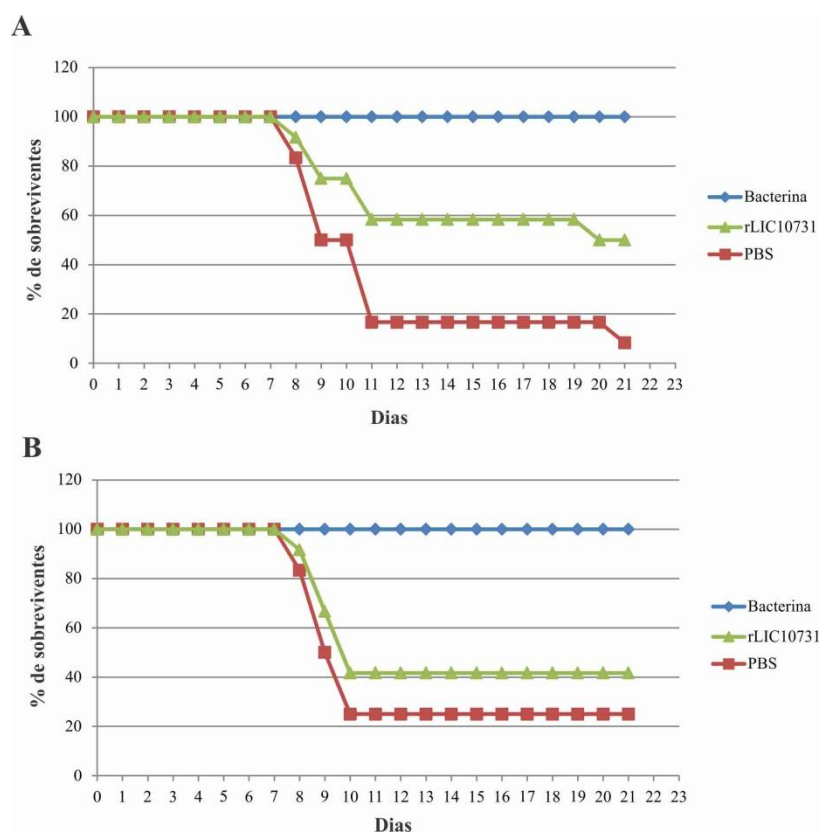
A identificação de proteínas imunogênicas de *Leptospira* como candidatos vacinais tornou-se o principal foco na pesquisa sobre leptospirose. Proteínas de membrana externa bem conservadas são alvos vacinais promissores (CULLEN et al., 2002; HAAKE et al., 1999), porque elas teriam a vantagem de induzir uma resposta imune cruzada entre diferentes espécies e sorovares, além da possibilidade de induzirem imunidade de memória.

Partindo deste princípio, foi avaliado se a imunização de hamsters com a proteína rLIC10731 seria capaz de induzir uma resposta imune protetora contra desafio letal com *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm. Para tanto, os animais foram imunizados com 50 μg da proteína recombinante por dose, totalizando duas doses no intervalo de 15 dias cada, sendo então desafiados por inoculação intraperitoneal no 30º dia, com um total de 2.500 leptospiiras por animal.

O uso de modelos animais é indispensável para a compreensão da biologia, transmissão, colonização do hospedeiro e patogênese de *Leptospira* spp.. Hamsters são o modelo experimental padrão para leptospirose aguda (FAINE et al., 1999). A infecção experimental produz uma cinética de doença similar à observada em humanos, além de manifestações severas, apresentando quadro icterico e síndromes hemorrágicas graves (SILVA et al., 2008).

Foram feitos dois experimentos independentes, e como controles foram utilizados a imunização com bacterina (bactéria inativada, controle de sobrevivência) e imunização com solução salina (PBS, controle de morte). Hamsters recém-desmamados foram distribuídos em grupos de 12 animais. A cinética de sobrevivência dos dois experimentos pode ser visualizada na Figura 46.

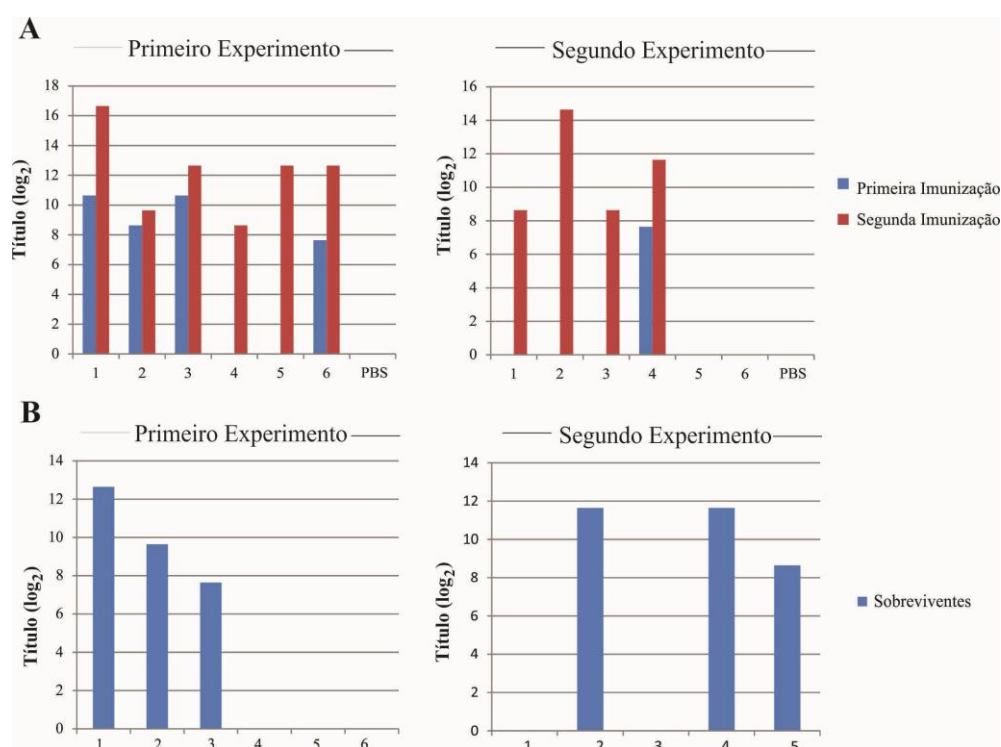
Figura 46 - Cinética de sobrevivência dos animais nos experimentos de desafio.



Cinética de sobrevivência dos animais imunizados com bacterina, rLIC10731 ou PBS, em dois experimentos distintos (**A**) ou (**B**). Hamsters foram imunizados com 50 µg da proteína recombinante por dose, totalizando duas doses no intervalo de 15 dias cada, sendo então desafiados por inoculação intraperitoneal no 30º dia, com um total de 2.500 leptospiras por animal e acompanhados por 21 dias quanto à morte ou aparecimento dos sintomas típicos de leptospirose.

O título dos animais imunizados provenientes dos dois experimentos pode ser visualizado na Figura 47, bem como o título dos animais sobreviventes. Para a nossa surpresa, o soro de alguns animais sobreviventes não demonstrou reatividade com a proteína recombinante, o que nos leva a supor que possivelmente o mecanismo protetor não foi humoral, podendo então a sobrevivência ser atribuída a algum mecanismo de imunidade celular ou então que estes animais eram naturalmente resistentes à infecção por *Leptospira* spp.

Figura 47 - Titulação do soro dos animais dos experimentos de desafio.



Em **(A)** seis animais imunizados com a proteína rLIC10731 foram monitorados quanto à produção de anticorpos contra a proteína recombinante, durante as duas imunizações. Os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital e a presença de anticorpos no soro foi avaliada por ELISA, utilizando anticorpo secundário anti-IgG de hamster conjugado com peroxidase (1:3.000). Em **(B)** tem-se a titulação dos animais sobreviventes após desafio letal com leptospiras. A detecção de anticorpos anti-rLIC10731 foi feita da mesma maneira descrita em **(A)**. Os títulos são expressos em log₂. Cabe ressaltar que a numeração dos animais sobreviventes **(B)** não tem relação com a numeração dos animais avaliados em **(A)**.

Os animais sobreviventes foram sacrificados e seus rins coletados e macerados para o isolamento de leptospiras. Esta proteção parcial conferida pela proteína rLIC10731 não foi esterilizante, uma vez que as culturas foram positivas para a presença das bactérias. Dados

semelhantes foram obtidos por Yan et al. (2010) em desafio utilizando proteínas semelhantes a OmpA, uma vez que a proteção conferida também não foi esterilizante.

Uma das grandes problemáticas deste experimento são as variações na virulência da cepa infectante e a alta variabilidade genética do modelo animal em uso. Nós vamos testar uma metodologia de congelamento de leptospiros, para que o fator virulência seja fixado e para que os resultados sejam mais consistentes.

Conforme mencionado, os animais foram desafiados pela rota intraperitoneal, o qual não reflete a infecção natural do patógeno. Alguns experimentos de desafio utilizando infecção subcutânea (TRUCCOLO et al., 2002) ou pela membrana dos olhos em gado (BOLIN; ALT, 2001) têm sido utilizados, a fim de mimetizar a infecção natural. Porém, o método de inoculação intraperitoneal permite uma reprodutibilidade na dose de leptospiros inoculadas e por isso tem sido extensivamente utilizado.

Haake et al. (1999) verificaram que a proteína OmpL1 expressa na superfície de *E. coli* não conferiu proteção significativa em hamsters imunizados, em experimentos de desafio letal. Porém, quando administrada juntamente com a proteína LipL41 (esta também expressa na superfície de *E. coli*), foi verificado um efeito sinérgico, com proteção significativa dos animais imunizados (71%). Dong et al. (2008) verificaram que imunização com a proteína recombinante OmpL1 pôde aumentar significativamente a sobrevivência de porquinhos da índia desafiados com espécies de *Leptospira*.

A proteína rLIC10645 também já foi testada quanto ao seu potencial imunoprotetor em hamsters por Félix et al. (2011), e os resultados demonstraram que a imunização com esta proteína não protegeu os animais contra o desafio letal.

Novas combinações de antígenos proteicos, bem como novos adjuvantes, deverão ser testados para que se consiga uma formulação vacinal interessante para controle da leptospirose.

5 CONCLUSÕES

Os genes OmpL1, LIC10731 e LIC10645 foram escolhidos para estudo com base na localização celular predita de suas respectivas proteínas. OmpL1 já é sabidamente uma proteína de membrana externa, bastante caracterizada na literatura, embora algumas informações ainda estavam faltantes. Dentre os três genes, OmpL1 mostrou-se o mais presente em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira*, sendo encontrado em todas espécies patogênicas e ausente na espécie saprofítica. A análise da presença das proteínas nos extratos proteicos de *Leptospira* spp. confirma esse achado, visto que a proteína OmpL1 nativa foi reconhecida na grande maioria das espécies e sorovares patogênicos testados, por meio de *Western blotting* utilizando antissoro homólogo produzido em camundongo.

Para obtenção das proteínas recombinantes, os fragmentos referentes aos genes OmpL1, LIC10731 e LIC10645 foram obtidos por amplificação por meio da técnica de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos que se anelam ao começo e final dos genes. Os fragmentos foram clonados no vetor pGEM-T Easy e então subclonados no vetor de expressão pAE. As construções finais (pAE-gene) foram confirmadas por ensaio de restrição e por sequenciamento, o qual demonstrou a ausência de mutações e que todos genes estavam na fase de leitura correta.

As proteínas recombinantes foram mais bem expressas na cepa de *E. coli* BL21 (DE3) StarpLysS, na forma insolúvel, como corpúsculos de inclusão, os quais foram solubilizados na presença de ureia. O vetor pAE adiciona um epítipo de seis histidinas na extremidade N-terminal das proteínas recombinantes, as quais, então, foram purificadas por cromatografia de afinidade ao metal.

Por ensaio de dicroísmo circular, pôde-se verificar que as três proteínas recombinantes possuíam estruturas secundárias após sua renaturação, o que nos deu segurança para prosseguir nas caracterizações imunológicas e funcionais.

As proteínas recombinantes se mostraram imunogênicas em modelo animal, estimulando ambas as respostas humoral e celular, o que é denotado pelo aumento dos títulos no decorrer das imunizações e proliferação de esplenócitos em cultura celular. A proteína recombinante OmpL1 apresentou a melhor resposta humoral, ao passo que a proteína rLIC10731 apresentou a resposta celular mais proeminente.

Foram detectados anticorpos anti-proteínas recombinantes em soros de hamsters infectados com leptospiras e soros de pacientes diagnosticados com leptospirose, sendo a

reatividade da proteína OmpL1 bastante alta, o que sugere que esta proteína é expressa durante a infecção. Esta proteína pode ter um potencial na composição de um kit diagnóstico.

A fim de se verificar o papel dessas proteínas na colonização e invasividade da bactéria, foi estudada a interação das proteínas recombinantes com componentes da matriz extracelular e soro. Todas as proteínas se ligaram à laminina e plasminogênio de maneira dose-dependente, e adicionalmente a proteína OmpL1 se ligou à fibronectina plasmática e fibrinogênio.

Quando o plasminogênio está ligado às proteínas recombinantes, este é passível de ser convertido à sua forma enzimaticamente ativa, a plasmina, a qual tem um papel na penetração tecidual e invasão de *Leptospira* spp. A ligação das proteínas ao plasminogênio se mostrou bastante dependente dos resíduos de lisinas contidos nas mesmas.

A proteína OmpL1, quando ligada ao fibrinogênio, é capaz de reduzir a formação do coágulo de fibrina, mediada pela enzima trombina. Este achado pode ser relacionado ao aparecimento do quadro hemorrágico durante a leptospirose.

Os resultados dos ensaios de localização celular, como imunofluorescência e proteólise por proteinase K, sugerem fortemente que as proteínas codificadas pelos genes LIC10731 e LIC10645 são de membrana externa. Assim sendo, estas proteínas estão na interface bactéria-hospedeiro e provavelmente desempenham um papel na patogênese das leptospirosas.

Ensaio de imunoproteção indicam que a proteína rLIC10731 possui um potencial imunoprotetor parcial em modelo animal de infecção aguda, embora esta proteção não tenha sido esterilizante.

Em conclusão, foram estudadas três proteínas de *Leptospira interrogans*, que, segundo indicam os resultados, são localizadas na membrana externa da bactéria e por isso podem desempenhar um papel na colonização, persistência e invasão tecidual.

REFERÊNCIAS¹

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.
- ADLER, B. et al. Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. **Veterinary Microbiology**, v. 153, p. 73-81, 2011.
- ADLER, B. et al. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, p. 452-457, 1980.
- 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. et al. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. **Journal of Infection**, v. 59, p. 264-276, 2009.
- BABER, M. D.; STUART, R. D. Leptospirosis canicola: a case treated with penicillin. **Lancet**, v. 2, p. 594-596, 1946.
- BAJANI, M. D. et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 803-809, 2003.
- BARBOSA, A. S. et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 6356-6364, 2006.

¹ De acordo com:

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

- 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.
- BARBOSA, A. S. et al. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 3207-3216, 2010.
- BARNETT, J. K. et al. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 853-861, 1999.
- BARWICK, R. S. et al. Epidemiologic features of equine *Leptospira interrogans* of human significance. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 36, p. 153-165, 1998.
- BENSCHOP, J. et al. Sero-prevalence of leptospirosis in workers at a New Zealand slaughterhouse. **New Zealand Medical Journal**, v. 122, p. 39-47, 2009.
- 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.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 757-771, 2003.
- BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 995-1000, 2001.
- BOON HINCKLEY, M. et al. A *Leptospira interrogans* enzyme with similarity to yeast Ste14p that methylates the 1-phosphate group of lipid A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 30214-30224, 2005.
- BOURHY, P. et al. Complete nucleotide sequence of the LE1 prophage from the spirochete *Leptospira biflexa* and characterization of its replication and partition functions. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 3931-3940, 2005.
- BOYLE, E.C.; FINLAY, B.B. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 633-639, 2003.
- BRAMEL, R. G.; SCHEIDY, S. F. The effect of revaccination of horses and cattle with *Leptospira pomona* bacterin. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 128, p. 399-400, 1956.
- BRANGER, C. et al. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 4062-4069, 2005.

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

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

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

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.

CAIMI, K. et al. A combined approach of VNTR and MLST analysis: improving molecular typing of Argentinean isolates of *Leptospira interrogans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 644-651, 2010.

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

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M. et al. Leptospiral Immunoglobulin-like Proteins Interact With Human Complement Regulators Factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, p. 995-1004, 2012.

CHALAYON, P. et al. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, p. 289-297, 2011.

CHAPMAN, A. J.; FAINE, S.; ADLER, B. Antigens recognized by the human immune response to vaccination with a bivalent hardjo/pomona leptospiral vaccine. **FEMS Microbiology Immunology**, v. 2, p. 111-118, 1990.

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

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

CHAVAKIS, T. et al. Staphylococcus aureus interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 94, p. 278-285, 2005.

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.

CHU, K. M. et al. Identification of *Leptospira* species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in south India. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 1314-1321, 1998.

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

COLEMAN, J. L.; BENACH, J. L. Use of the plasminogen activation system by microorganisms. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 134, p. 567-576, 1999.

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

CULLEN, P. A. et al. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 2311-2318, 2002.

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

DAVIS, J. M.; HAAKE, D. A.; RAMAKRISHNAN, L. *Leptospira interrogans* stably infects zebrafish embryos, altering phagocyte behavior and homing to specific tissues. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, p. e463, 2009.

DESAI, S. et al. Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 691-697, 2009.

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

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.

DOOLITTLE, R. F. Fibrinogen and fibrin. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, p. 195-229, 1984.

ELLINGHAUSEN JR., H. C.; MCCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira Pomona* and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80. **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, p. 45-51, 1965.

ELLIS, W. A. et al. Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A**, v. 255, p. 323-335, 1983.

ESHGHI, A. et al. *Leptospira interrogans* catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence. **Infection and Immunity**, 2012. In press.

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

FELIX, S. R. et al. Subunit approach to evaluation of the immune protective potential of leptospiral antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, p. 2026-2030,

FINLAY, B. B.; COSSART, P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. **Science**, v. 276, p. 718-725, 1997.

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

FLANNERY, B. et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3303-3310, 2001.

FUJIWARA, S. et al. Structure and distribution of N-linked oligosaccharide chains on various domains of mouse tumour laminin. **Biochemical Journal**, v. 252, p. 453-461, 1988.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Diagnóstico rápido para leptospirose**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: < <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/reativos/testes-rapidos/dppr-leptospirose> > Acesso em: 10 set. 2012.

GALEN, R. S.; GAMBINO, S. R. **Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis**. New York: John Wiley & Sons, 1975.

GANOZA, C. A. et al. Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by *Leptospira*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e612, 2010.

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

GIRONS, I. S. et al. The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* shuttle vector. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 5700-5705, 2000.

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

GREENE, C.E.; MILLER, M.A.; BROWN, C.A. Leptospirosis. In: GREEN, C.E. (Ed). **Infectious diseases of the dog and cat**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998. p. 273-81.

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

GRIFFITH, M.E.; HOSPENTHAL, D.R.; MURRAY, C.K. Antimicrobial therapy of leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, p. 533–537, 2006.

GROMIHA, M. M.; AHMAD, S.; SUWA, M. TMBETA-NET: discrimination and prediction of membrane spanning beta-strands in outer membrane proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. W164-167, 2005.

GROOMS, D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v. 66, p. 624-628, 2006.

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

GUERREIRO, H. et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 4958-4968, 2001.

HAAKE, D. A. et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 4225-4234, 1993.

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. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular Microbiology**, 2010. In press.

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. et al. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 2818-2828, 2004.

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

HANSON, L. E.; TRIPATHY, D. N.; KILLINGER, A. H. Current status of leptospirosis immunization in swine and cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 161, p. 1235-1243, 1972.

HEATH JR., C. W.; ALEXANDER, A. D.; GALTON, M. M. Leptospirosis in the United States. **The New England Journal of Medicine**, v. 273, p. 857-864, 1965.

HOAG, W. G.; BELL, W. B. An immunogenic agent for the protection of cattle against *Leptospira pomona*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 16, p. 381-385, 1955.

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.

HOOKEY, J. V. Detection of Leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69, p. 267-274, 1992.

HULL-JACKSON, C. et al. Evaluation of a commercial latex agglutination assay for serological diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1853-1855, 2006.

INVITROGEN. **BL21 Star™(DE3) One Shot® BL21 Star™(DE3)pLysS One Shot® Chemically Competent Cells.** Disponível em: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/oneshotbl21star_man.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2012.

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

JOHNSON, R. C.; ROGERS, P. Metabolism of leptospire. II. The action of 8-azaguanine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 13, p. 1621-1629, 1967.

JOUGLARD, S. D. et al. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospire. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 747-752, 2006.

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

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American Statistical Association**, v. 53, p. 457-481, 1958.

KATZ, A. R. et al. Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1834-1841, 2001.

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

KHARAZMI, A. Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*. **Immunology Letters**, v. 30, p. 201-205, 1991.

KMETY, E.; DIKKEN, H. **Classification of the species *Leptospira interrogans* and the history of its serovars:** a history of the publication of the serovars of leptospire, and a catalogue of their relationships. Groningen, Netherlands: University Press Groningen, 1993.

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 Microbiology**, v. 7, p. 736-747, 2009.

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

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

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

LANGSTON, C. E.; HEUTER, K. J. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, p. 791-807, 2003.

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

LAW, R. H. et al. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. **Cell Reports**, v. 1, p. 185-190, 2012.

LEON, A. et al. Identification of pathogenic *Leptospira* strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 218-221, 2006.

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

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 296-326, 2001.

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.

LEVETT, P. N. et al. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 45-49, 2005.

LEVETT, P. N. et al. Surveillance of leptospiral carriage by feral rats in Barbados. **West Indian Medical Journal**, v. 47, p. 15-17, 1998.

LI, C. et al. Spirochete periplasmic flagella and motility. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 2, p. 345-354, 2000.

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

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. 253-263, 2009.

LILENBAUM, W. et al. Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 14-17, 2008.

LIN, X. et al. Characterization of conserved combined T and B cell epitopes in *Leptospira interrogans* major outer membrane proteins OmpL1 and LipL41. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 21, 2011.

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

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

LIU, D. et al. PCR detection of pathogenic *Leptospira* genomospecies targeting putative transcriptional regulator genes. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 272-277, 2006.

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

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

LOUIS-JEUNE, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; PEREZ-IRATXETA, C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. **Proteins**, 2011. In press.

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.

MACIEL, E. A. et al. Household transmission of leptospira infection in urban slum communities. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, p. e154, 2008.

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

MAROTTO, P. C. et al. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 1561-1563, 1999.

MARRACK, P.; MCKEE, A. S.; MUNKS, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 287-293, 2009.

MARSHALL, V.; KERR, D. D. Early protection of dogs by a leptospira bacterin. **Modern Veterinary Practice**, v. 55, p. 430-432, 1974.

MARTINEZ, R. et al. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 15, p. 249-255, 2004.

MATSUNAGA, J. et al. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 2864-2874, 2007.

MATSUNAGA, J. et al. LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. **Microbiology**, v. 152, p. 3777-3786, 2006.

MATTHIAS, M. A.; LEVETT, P. N. Leptospiral carriage by mice and mongooses on the island of Barbados. **West Indian Medical Journal**, v. 51, p. 10-13, 2002.

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

MCCLAIN, J. B. L. et al. Doxycycline therapy for leptospirosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 100, p. 696-698, 1984.

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

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. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2219-2224, 1992.

MESLIN, F. X. Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO Perspective. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, p. 1-8, 1997.

MINETTE, H. P. Leptospirosis in poikilothermic vertebrates. A review. **The International Journal of Zoonoses**, v. 10, p. 111-121, 1983.

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.

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

MURRAY, G. L. et al. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 810-816, 2009a.

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, 2009b.

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

NAIMAN, B. M. et al. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gamma delta T lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 7550-7558, 2001.

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

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.

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

NASCIMENTO, A. L. et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 459-477, 2004a.

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, 2004b.

NATARAJASEENIVASAN, K. et al. Surface-associated Hsp60 chaperonin of *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis N2 strain as an immunoreactive protein. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, p. 1383-1389, 2011.

NATARAJASEENIVASAN, K. et al. Serodiagnosis of severe leptospirosis: evaluation of ELISA based on the recombinant OmpL1 or LipL41 antigens of *Leptospira interrogans* serovar autumnalis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 102, p. 699-708, 2008.

NEELY, M. N.; PFEIFER, J. D.; CAPARON, M. Streptococcus-zebrafish model of bacterial pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3904-3914, 2002.

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.

NICODEMO, A. C., et al. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, p. 181-187, 1997.

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

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.

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

PALANIAPPAN, R. U. et al. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 111-117, 2005.

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

PANAPHUT, T.; DOMRONGKITCHAIPORN, S.; THINKAMROP, B. Prognostic factors of death in leptospirosis: a prospective cohort study in Khon Kaen, Thailand. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 6, p. 52-59, 2002.

PARK, S. K. et al. Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: a study of 93 patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, p. 345-351, 1989.

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

PATTI, J. M. et al. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, p. 585-617, 1994.

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

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. e1607, 2008.

PINNE, M.; CHOY, H. A.; HAAKE, D. A. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e815, 2010.

PINNE, M.; HAAKE, D. A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v. 4, p. e6071, 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**, v. 2, p. 1265-1276, 2000.

PROMEGA. **pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Protocol**. Disponível em: <<http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>>. Acesso em: 20 ago. 2012.

QIU, X. F. et al. Establishment and application of ELISAs based on rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 fusion antigen of *Leptospira interrogans*. **Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 37, p. 592-598, 2008.

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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 25420-25429, 2004.

RAMOS, A. C.; SOUZA, G. N.; LILENBAUM, W. Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil. **Theriogenology**, v. 66, p. 1021-1025, 2006.

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**, v. 37, p. 1103-1109, 2004.

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

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

RISTOW, P. et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLOS Pathogens**, v. 3, p. e97, 2007.

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

RIVERA, J. et al. Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 98, p. 503-511, 2007.

RODRIGUEZ-GONZALEZ, I. et al. Efficacy of Spirolept vaccine against human leptospirosis as estimated by passive protection of laboratory rodents. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 34, p. 196-200, 2004.

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

RUSSELL, K. L. et al. An outbreak of leptospirosis among Peruvian military recruits. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, p. 53-57, 2003.

RUSSELL, R. W. R. Treatment of leptospirosis with oxytetracycline. **Lancet**, v. 2, p. 1143-1145, 1958.

SAINT GIRONS, I. et al. First isolation of bacteriophages for a spirochaete: potential genetic tools for *Leptospira*. **Research in Microbiology**, v. 141, p. 1131-1138, 1990.

SALAUN, L. et al. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3954-3962, 2006.

SALONEN, E. M.; ZITTING, A.; VAHERI, A. Laminin interacts with plasminogen and its tissue-type activator. **FEBS Letters**, v. 172, p. 29-32, 1984.

SANCHEZ, R. M. et al. Reactogenicity and immunogenicity of Cuban trivalent inactivated vaccine against human leptospirosis in different vaccination schedules. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 54, p. 37-43, 2002.

SANDERS, E. J. et al. Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996 [correction of 1966]. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 399-404, 1999.

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.

SARKAR, J. et al. Leptospirosis: a re-emerging infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, p. 500-502, 2012.

SCHMIDT, A. et al. Absolute quantification of microbial proteomes at different states by directed mass spectrometry. **Molecular Systems Biology**, v. 7, p. 510, 2011.

SCHOONE, G. J. et al. An immunoprotective monoclonal antibody directed against *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 73-78, 1989.

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.

SEHGAL, S. C. et al. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 249-255, 2000.

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.

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.

SHENBERG, E.; TORTEN, M. A new leptospiral vaccine for use in man. I. Development of a vaccine from *Leptospira* grown on a chemically defined medium. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 128, p. 642-646, 1973.

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.

SILVA, E. F. et al. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**, v. 26, p. 3892-3896, 2008.

SLACK, A. et al. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p. 361-366, 2007.

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

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

SRIMANOTE, P. et al. Recombinant ligA for leptospirosis diagnosis and ligA among the *Leptospira* spp. clinical isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, p. 73-81, 2008.

STERN, E. J. et al. Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 843-849, 2010.

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

STUDIER, F. W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. **Journal of Molecular Biology**, v. 219, p. 37-44, 1991.

SUN, A. et al. A sensitive and specific IgM-ELISA for the serological diagnosis of human leptospirosis using a rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 fusion protein. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 24, p. 291-299, 2011.

SUWANCHAROEN, D. et al. Development of a novel primer combination to detect pathogenic *Leptospira* by loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Microbiological Methods**, 2012. In press.

TAKAFUJI, E. T. et al. An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 310, p. 497-500, 1984.

TEIGLAND, M. B. An experience with a *Leptospira pomona* bacterin in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 129, p. 259-260, 1956.

THAIPADUNGPANIT, J. et al. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, p. e56, 2007.

TOMA, C. et al. Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 13, p. 1783-1792, 2011.

TORTEN, M. et al. A new leptospiral vaccine for use in man. II. Clinical and serologic evaluation of a field trial with volunteers. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 128, p. 647-651, 1973.

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

TREVEJO, R. T. et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, p. 1457-1463, 1998.

TRUCCOLO, J. et al. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 848-853, 2002.

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

TUERO, I.; VINETZ, J. M.; KLIMPEL, G. R. Lack of demonstrable memory T cell responses in humans who have spontaneously recovered from leptospirosis in the Peruvian Amazon. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, p. 420-427, 2010.

TULSIANI, S. M. et al. High-resolution melt-curve analysis of random-amplified-polymorphic-DNA markers, for the characterisation of pathogenic *Leptospira*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 104, p. 151-161, 2010.

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

VAN STOKKUM, I. H. et al. Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. **Analytical Biochemistry**, v. 191, p. 110-118, 1990.

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

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

VERMA, A. et al. Cross-reactivity of antibodies against leptospiral recurrent uveitis-associated proteins A and B (LruA and LruB) with eye proteins. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e778, 2010.

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

VIEIRA, M. L. et al. A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276, p. 172-180, 2007.

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.

VIEIRA, M. L. et al. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v. 5, p. e11259, 2010a.

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

VIEIRA, M. L. et al. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. **Microbial Pathogenesis**, v. 51, p. 360-365, 2011.

VIJAYACHARI, P.; SEHGAL, S. C. Recent advances in the laboratory diagnosis of leptospirosis and characterisation of leptospire. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, p. 320-322, 2006.

VINETZ, J. M. et al. Sporadic urban leptospirosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 125, p. 794-798, 1996.

VINETZ, J. M. A Mountain out of a molehill: do we treat acute leptospirosis, and if so, with what? **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 1514-1515, 2003.

WANG, H. et al. Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through Toll-like receptor 2- and 4-mediated JNK and NF-kappaB signaling pathways. **PLoS One**, v. 7, p. e42266, 2012.

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

WATT, G. et al. Placebocontrolled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. **Lancet**, v. 27, p. 433-435, 1988.

WEISEL, J. W. Fibrinogen and fibrin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 70, p. 247-299, 2005.

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

WILSON, J. H. et al. Experiments with an inactivated hepatitis leptospirosis vaccine in vaccination programmes for dogs. **Veterinary Record**, v. 100, p. 552-554, 1977.

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. **The Journal of Immunology Methods**, v. 78, p. 143-153, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, Surveillance and control**. Geneva: WHO, 2003. ISBN 9241545895. Disponível em: < <http://www.who.int/zoonoses/diseases/Leptospirosisurveillance.pdf> >. Acesso em: 20 Aug 2012.

WU, B. T. et al. [The OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar lai induces apoptosis in A549 via Ca²⁺ signal pathway]. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 42, p. 298-302, 2011.

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, 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.

YANAGIHARA, Y. et al. Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, p. 399-413, 2007.

YERSIN, C. et al. Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 94, p. 71-16, 2000.

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

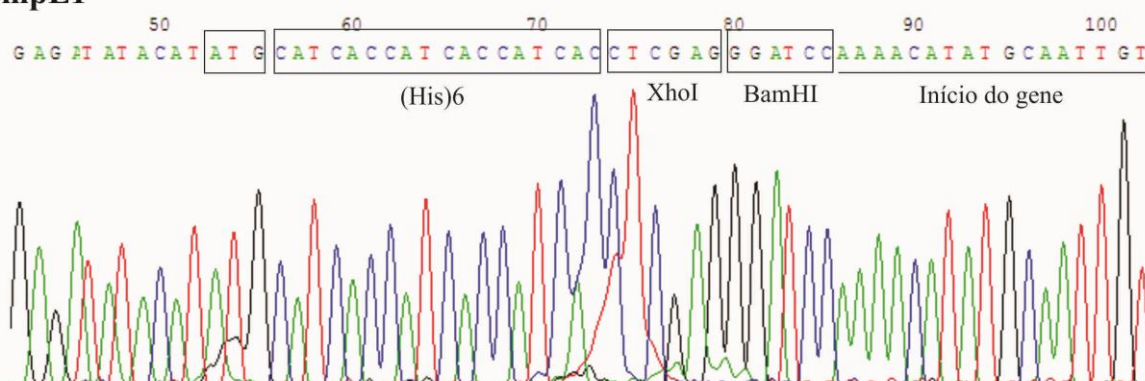
ZHANG, L. et al. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. **Molecular Microbiology**, v. 83, p. 1006-1023, 2012.

ZUERNER, R. et al. Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 2, p. 455-462, 2000.

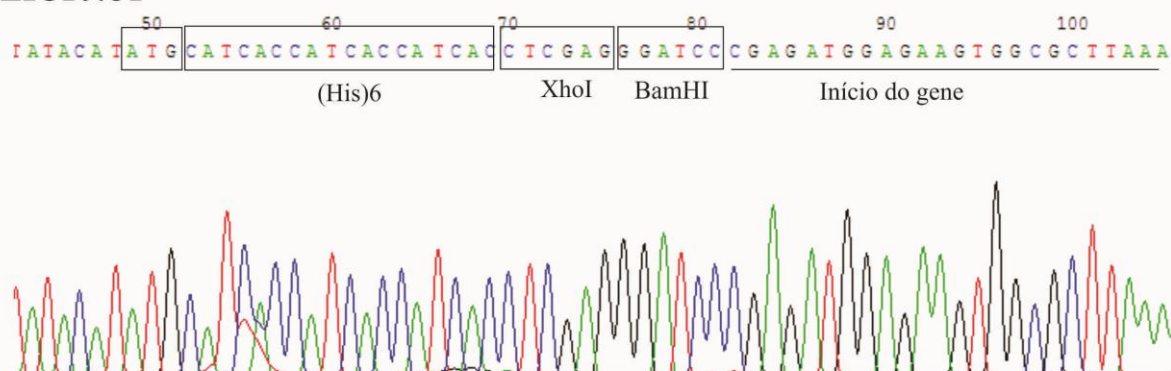
APÊNDICES

APÊNDICE A – Início das construções finais dos genes clonados no vetor de expressão pAE.

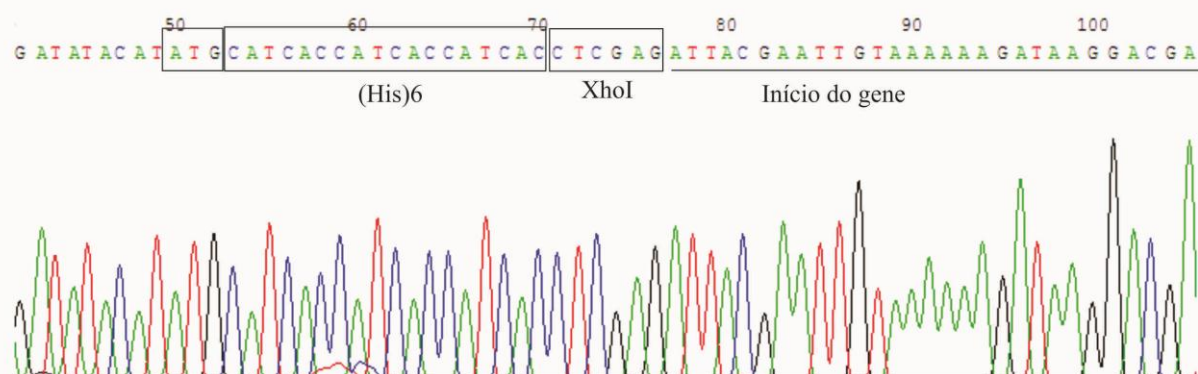
OmpL1



LIC10731



LIC10645



APÊNDICE B- Artigo publicado em periódico

Artigo 1- FERNANDES et al. (2012)- OmpL1 Is an Extracellular Matrix- and Plasminogen-Interacting Protein of *Leptospira* spp.

OmpL1 Is an Extracellular Matrix- and Plasminogen-Interacting Protein of *Leptospira* spp.

Luis G. V. Fernandes,^{a,b} Monica L. Vieira,^{a,b} Karin Kirchgatter,^c Ivy J. Alves,^a Zenaide M. de Morais,^d Silvio A. Vasconcellos,^d Eliete C. Romero,^e and Ana L. T. O. Nascimento^{a,b}

Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, São Paulo, Brazil^a; Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil^b; Núcleo de Estudos em Malária, Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN)/Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil^c; Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil^d; and Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil^e

Leptospirosis is a zoonosis with multisystem involvement caused by pathogenic strains of the genus *Leptospira*. OmpL1 is an outer membrane protein of *Leptospira* spp. that is expressed during infection. In this work, we investigated novel features of this protein. We describe that OmpL1 is a novel leptospiral extracellular matrix (ECM)-binding protein and a plasminogen (PLG) receptor. The recombinant protein was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) Star/pLysS as inclusion bodies, refolded, and purified by metal-chelating chromatography. The protein presented a typical β -strand secondary structure, as evaluated by circular dichroism spectroscopy. The recombinant protein reacted with antibodies in serum samples from convalescent leptospirosis patients with a high specificity compared to serum samples from individuals with unrelated diseases. These data strengthen the usefulness of OmpL1 as a diagnostic marker of leptospirosis. The characterization of the immunogenicity of recombinant OmpL1 in inoculated BALB/c mice showed that the protein has the capacity to elicit humoral and cellular immune responses, as denoted by high antibody titers and the proliferation of lymphocytes. We demonstrate that OmpL1 has the ability to mediate attachment to laminin and plasma fibronectin, with K_D (equilibrium dissociation constant) values of $2,099.93 \pm 871.03$ nM and $1,239.23 \pm 506.85$ nM, respectively. OmpL1 is also a PLG receptor, with a K_D of 368.63 ± 121.23 nM, capable of generating enzymatically active plasmin. This is the first report that shows and characterizes OmpL1 as an ECM-interacting and a PLG-binding protein of *Leptospira* spp. that may play a role in bacterial pathogenesis when expressed during infection.

Leptospirosis is considered an important reemerging infectious disease. It is a zoonosis caused by pathogenic *Leptospira* spp. that is transmitted from reservoir hosts to humans through water and soil contaminated with their urine (18). Symptoms of the disease include fever, vomiting, headache, diarrhea, and abdominal and generalized muscle pain. Progression to multiorgan system complications, known as Weil's syndrome, occurs in 5 to 15% of cases, with mortality rates of 5 to 40% (18, 30, 34, 55).

At present, available vaccines are based on inactivated whole-cell or membrane preparations of pathogenic leptospires. They confer protective responses mostly through the induction of antibodies against leptospiral lipopolysaccharide (1, 14). However, these vaccines do not induce long-term protection against infection and do not provide cross-protective immunity against leptospiral serovars not included in the vaccine preparation (1). Due to the large number of leptospiral serovars (8), conserved and protective antigens are being pursued.

Surface-exposed proteins are potential targets for inducing immune responses during infection and may also mediate the initial process of adhesion to host cells. Indeed, several of these proteins have been reported to be leptospiral adhesins (2, 4, 12, 28, 44, 49). Furthermore, well-conserved outer membrane proteins (OMPs) are promising vaccine targets, because they would have an advantage in inducing cross-protective immunity (31). After adherence, pathogens have to overcome host tissue barriers to reach blood circulation and organs. We reported previously that leptospires bind plasminogen (PLG) at their surface and that proteolytic activity is achieved due to the generation of plasmin (77).

OmpL1 is a 31-kDa leptospiral transmembrane OMP containing 320 amino acid residues and was characterized previously by

Haake and colleagues (23). Several studies pointed out the importance of OmpL1 as a serological marker for the diagnosis of human (17, 20, 47, 56, 67, 78) and canine (29, 48) cases of leptospirosis.

This work describes the expression and characterization of recombinant OmpL1, the immune response induced in BALB/c mice, and the reactivity of this protein with leptospirosis-positive serum samples. We also describe the ability of OmpL1 to mediate attachment to various extracellular matrix (ECM) and serum components. We report that OmpL1 is a novel surface adhesin that binds to laminin and plasma fibronectin, interacts with PLG, is expressed during infection (6), and may participate in leptospiral pathogenesis.

MATERIALS AND METHODS

ECM and biological components. Macromolecules, including the control protein fetuin, were purchased from Sigma-Aldrich (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;

Received 9 May 2012 Returned for modification 14 June 2012

Accepted 8 July 2012

Published ahead of print 16 July 2012

Address correspondence to Ana L. T. O. Nascimento, tabet@butantan.gov.br.

Editor: A. Camilli

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/IAI.00474-12

and collagen type I was isolated from rat tail. Native plasminogen, which was purified from human plasma, and human factor H were purchased from EMD Chemicals, Inc. (San Diego, CA). C4bp was obtained from Complement Technology, Inc. (Tyler, TX).

Bacterial strains and serum samples. The pathogenic, high-passage-number, nonvirulent *Leptospira* strains used were *L. interrogans* serovar Canicola strain Hound Utrecht IV, *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M 20, *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain RGA, *L. interrogans* serovar Pomona strain Pomona, *L. borgpetersenii* serovar Castellonis strain Castellon 3, *L. borgpetersenii* serovar Whitcombi strain Whitcomb, *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa strain Moskva V, *L. kirschneri* serovar Cynoptery strain 3522C, *L. santarosai* serovar Shermani strain 1342 K, and *L. noguchii* serovar Panama strain CZ 214, and the nonpathogenic *Leptospira* strain used was *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc. The leptospire were cultured at 28°C under aerobic conditions in liquid EMJH medium (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ) with 10% rabbit serum, which was enriched with L-asparagine (0.015%, wt/vol), sodium pyruvate (0.001%, wt/vol), calcium chloride (0.001%, wt/vol), magnesium chloride (0.001%, wt/vol), peptone (0.03%, wt/vol), and meat extract (0.02%, wt/vol) (69). Low-passage-number, virulent *L. interrogans* serovar Copenhageni strain FIOCRUZ L1-130 and *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Pomona Fromm were also used. Recently weaned male Golden Syrian hamsters were infected intraperitoneally with 500 µl of approximately 1×10^4 virulent *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Pomona Fromm leptospire. The animals were bled from the retro-orbital plexus after the appearance of symptoms such as loss of weight and mobility (approximately 5 days postinfection). *Leptospira* cultures were maintained in the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil. Serum samples from hamsters with confirmed leptospirosis were obtained by experimental infection with virulent leptospire. Human serum samples from patients with confirmed leptospirosis were obtained from the collection of the Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil. Serum samples from patients with unrelated infectious diseases were obtained from the serum collection of the Laboratório Imunoepidemiologia, Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), São Paulo, Brazil. *Escherichia coli* DH5α was used as the cloning host strain, and *E. coli* BL21 (DE3) Star/pLysS (66) was used as the host strain for the expression of the recombinant protein.

In silico sequence analysis. All sequences available in the GenBank database were employed to study the conservation and identity of OmpL1 by using CLUSTAL 2.1 multiple-sequence alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (33).

Cloning, expression, and purification of recombinant OmpL1. The amplification of the OmpL1 gene was performed by PCR with *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20 genomic DNA using forward (F) primer 5'-GGATCCAAACATATGCAATTGTAGG-3' and reverse (R) primer 5'-GGTACCTTAGAGTTCGTGTTATAACC-3'. PCR was performed with an initial denaturation step at 94°C for 5 min; 35 cycles at 94°C for 50 s, 60°C for 50 s, and 72°C for 2 min; and a final step at 72°C for 7 min. The reaction mix contained $1 \times$ PCR buffer, 0.2 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM each primer (F and R), 2.5 U *Taq* polymerase, and 100 ng of genomic DNA for a final volume of 25 µl. The gene sequence was amplified without the signal peptide tag, which was determined by the use of SignalP 3.0 software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The PCR fragment was cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Prodimol, Minas Gerais, Brazil) and subcloned into the *E. coli* expression vector pAE (57) at the BamHI and KpnI restriction sites. Plasmid pAE-OmpL1, containing the correct DNA sequence, was used to transform *E. coli* BL21 (DE3) Star/pLysS. Protein expression was obtained by the inoculation of 10 ml of a culture grown overnight into 800 ml of Luria-Bertani medium containing 50 µg/ml ampicillin and 34 µg/ml chloramphenicol. The culture was grown with continuous shaking at 37°C to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.6 and then induced for 3 h under constant agitation at 37°C in the presence of 0.1 mM IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside). The cells were

harvested by centrifugation, and 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 sonicator tip (Ultrasonic processor; GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ). The insoluble fraction was resuspended in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 8 M urea, and 1 mM β-mercaptoethanol. The protein was purified through Ni²⁺-charged beads of a chelating fast-flow chromatographic column (GE Healthcare) and extensively washed with buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, and increasing concentrations of imidazole (5 to 60 mM). Bound protein was eluted with buffer containing 1 M imidazole. The efficiency of the purification was evaluated by 12% SDS-PAGE. Fractions containing the recombinant protein were extensively dialyzed against PBS (phosphate-buffered saline) (pH 7.4) containing 0.1% glycine for 24 h.

Circular dichroism spectroscopy. Purified recombinant protein was dialyzed against sodium phosphate buffer (pH 7.4). Circular dichroism (CD) spectroscopy measurements were performed at 20°C by using a Jasco J-810 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan) equipped with a Peltier unit for temperature control. Far-UV CD spectra were measured by using a 1-mm-path-length cell at 0.5-nm intervals. The spectra were presented as averages of five scans recorded from 185 to 260 nm. The residual molar ellipticity is expressed in degrees × centimeter per decimole. Spectrum data were evaluated with K2D2 software (<http://ogic.ca/projects/k2d2/>), using a method that calculated the secondary-structure content from the ellipticity experimental data (52).

Microscopic agglutination test. The microscopic agglutination test (MAT) was performed according to methods described previously by Faine et al. (18). In brief, 22 serovars of *Leptospira* spp. were employed as antigens: serovars Australis, Autumnalis, Bataviae, Canicola, Castellonis, Celledoni, Copenhageni, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Sejroe, Shermani, Tarassovi, and Wolffi. All the strains were maintained in EMJH liquid medium at 29°C. A laboratory-confirmed case of leptospirosis was defined by the demonstration of a 4-fold increase of the microagglutination titer between paired serum samples. The probable predominant serovar was considered to be the one with the highest dilution that could cause 50% agglutination. The MAT was considered negative when the titer was below 100.

Antiserum production against recombinant protein and isotype determination. The recombinant protein was mixed with 10% (vol/vol) Alhydrogel [2% Al(OH)₃; Brenntag Biosector, Denmark], which was used as an adjuvant. Ten micrograms of OmpL1 was subcutaneously administered to five female BALB/c mice (4 to 6 weeks old). Two subsequent booster injections of the same protein preparation were given at 2-week intervals. Negative-control mice were injected with PBS. Two weeks after each immunization, the mice were bled from the retro-orbital plexus, and the resulting sera were analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of antibody titers. Prior to experiments, anti-recombinant protein sera were adsorbed into a suspension of *E. coli* cells to avoid reactivity with anti-*E. coli* antibodies (22). For isotype determinations, total IgG (immunoglobulin G), IgG1, and IgG2a (Southern Biotech, Birmingham, AL) levels were measured by the incubation of the pooled mouse sera with the recombinant protein, followed by incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse total IgG or goat anti-mouse IgG1 or IgG2a (1:2,000 dilution) and by incubation with HRP-conjugated anti-goat IgG (1:10,000). The OD₄₉₂ values exhibited by different dilutions of mouse serum were compared to a curve generated by coating the plates with different concentrations of mouse total IgG, IgG1, or IgG2a. IgM and IgA titers were also determined. In brief, plates were coated with recombinant protein (250 ng/well), and anti-OmpL1 sera and anti-PBS sera (negative control) were previously diluted (1:200 to 1:409,600), transferred into the OmpL1-coated wells, and incubated for 1 h at 37°C. Plates were washed, and HRP-conjugated goat anti-mouse IgA (1:5,000) (Sigma) was added and incubated as de-

scribed above. For IgM determinations, plates were incubated with goat anti-mouse IgM (1:5,000) (Sigma), followed by incubation with HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG (1:50,000) (Sigma). The titers were considered the maximum dilution that gave OD₄₉₂ values above 0.1.

Ethics statement. All animal studies were approved by the Ethics Committee of the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, under protocol no. 767/10. The Committee in Animal Research of the Instituto Butantan adopts the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation. Human serum samples from patients with confirmed leptospirosis were obtained from the collection of the Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil. Serum samples from patients with unrelated infectious diseases were obtained from the serum collection of the Laboratório Imunoepidemiologia, SUCEN, São Paulo, Brazil; the Laboratório Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT), USP, São Paulo, Brazil; the Laboratório Virologia, IMT, USP, São Paulo, Brazil; and Núcleo Estudos em Malária, SUCEN/IMT, USP, São Paulo, Brazil. Human sera from collections of the above-mentioned institutions were donated to be used for research purposes.

Immunoblotting assay. The purified recombinant protein was loaded onto 12% SDS-PAGE gels, and fractionated proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond ECL; GE Healthcare) on semidry equipment. Membranes were blocked with 10% nonfat dry milk and 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and then incubated with anti-OmpL1 (1:1,600) mouse polyclonal serum or monoclonal anti-His tag antibodies (1:1,000) (GE Healthcare) for 2 h at room temperature. After washing, the membranes were incubated with HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:5,000) (Sigma) in PBS for 1 h. The protein reactivity was revealed by use of the ECL reagent kit chemiluminescence substrate (GE Healthcare); the luminescence generated by the reaction was detected with the aid of a Carestream molecular imaging instrument (Equilab, Whitestone, NY) connected to Gel Logic 2200PRO.

OmpL1 genomic DNA and protein conservation among leptospiral strains. Leptospiral genomic DNAs were extracted as previously described (49), and sample integrity was verified by the amplification of the 16S rRNA gene. Cloning primers for OmpL1 were used for the DNA amplification of *Leptospira* spp., as described above. Fragments were visualized on a 1% agarose gel. For protein conservation, cultures of *Leptospira* spp. were harvested by centrifugation, washed three times with low-salt PBS containing 5 mM MgCl₂, and resuspended in PBS. A sample of each strain was applied onto a 12% SDS-PAGE gel, and after separation, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane on semidry equipment (GE Healthcare). The membrane was blocked overnight at 4°C with 10% nonfat dry milk and 1% BSA in PBS-T. After three washes with PBS-T, the membrane was incubated for 3 h at room temperature with antiserum against OmpL1 (1:500), produced in mice, followed by washes and incubation with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:5,000) for 1 h at room temperature. The membrane was then washed, and the reactivity was revealed as described above.

ELISA for detection of human and hamster antibodies. Human and hamster IgG antibodies against OmpL1 were detected by an ELISA, as previously described (50). In brief, MAT-negative and -positive serum samples from 32 patients with confirmed leptospirosis and 44 experimentally infected hamsters were diluted (1:100) and evaluated for total IgG by using HRP-conjugated anti-human IgG antibodies (1:5,000) (Sigma) and HRP-conjugated anti-hamster IgG antibody (1:5,000). Cutoff values were set at 3 standard deviations above the mean OD₄₉₂ of sera from 10 healthy individuals from the city of São Paulo, Brazil, or 5 noninfected hamsters. The reaction specificity was evaluated with serum samples from patients diagnosed with the following unrelated infectious diseases: dengue virus infection ($n = 13$), malaria ($n = 12$), HIV infection ($n = 15$), and Chagas' disease ($n = 20$). The sera were used at 1:100 dilutions, and the values for specificity were determined according to a method described previously by Galen and Gambino (21).

Lymphoproliferation assay. At the end of the immunization protocols, BALB/c mice were sacrificed, and their spleens were aseptically re-

moved and suspended in RPMI 1640 medium containing 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin, and 50 µg/ml of gentamicin. Spleens were macerated, and after erythrocyte lysis, splenocytes were resuspended in 1 ml of RPMI medium containing 10% fetal bovine serum and counted after staining with 0.4% trypan blue for viability. Splenocytes (5×10^5 cells/well) were plated in triplicate onto 96-well flat-bottom cell culture plates (Costar; Corning). Spleen cells were stimulated with 5 µg/ml of concanavalin A (ConA) (Sigma), which was employed as a positive control; 5 µg/ml of OmpL1; or medium alone, which was used as a negative control. Cells were cultured for 48 h at 37°C in 5% CO₂ in a humidified atmosphere, and proliferative rates were determined as a function of DNA synthesis, measured by the incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU) by a BrdU ELISA colorimetric kit (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN). Cells were labeled for 2 h with 20 µl of BrdU labeling solution. Subsequently, anti-BrdU antibody conjugated with HRP (1:100) was added, and the mixture was incubated for 90 min. The enzyme substrate solution was added, and incubation was carried out at room temperature for 15 min. The enzymatic reaction was stopped by the addition of 1 M H₂SO₄ to the mixture, and the optical density at 450 nm was measured in a microplate reader. The stimulation index (SI) was calculated as the ratio between the mean OD of cells cultured with the antigen and the mean OD of cells cultured in medium only in the immunized group.

Evaluation of cytokine production. For analyses of secreted cytokines, spleen cells were isolated and cultured as described above, except that the culture was made in 24-well tissue culture plates, with each well containing 5×10^6 cells. After 48 h, cell-free culture supernatants were collected and stored short term at -20°C. Levels of interleukin-4 (IL-4), IL-10, gamma interferon (IFN-γ), and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) were measured by an ELISA (PreproTech, Colonia Narvarte, Mexico) according to the manufacturer's instructions. Briefly, capture antibody was added to each well, and the plates were incubated overnight at 4°C, followed by incubation with blocking buffer for 1 h. Standard cytokines were diluted to create a concentration curve. One hundred microliters of each supernatant sample was then added, and plates were incubated for at least 2 h. After that, antibody detection solution was added (1:2,000), followed by 2 h of incubation; a substrate was added to each well; incubation proceeded at room temperature for reaction development; and readings were taken at 405 nm with the wavelength correction set at 650 nm in an ELISA plate reader. Results are expressed in pg/ml.

Binding of OmpL1 to ECM and to serum components. Protein attachment to individual macromolecules of the extracellular matrix and serum components was analyzed according to a previously reported protocol (4). Briefly, ELISA plates (Costar High Binding; Corning) were coated with 1 µg of the ECM component or BSA (negative control), gelatin, and fetuin (highly glycosylated attachment-negative control protein) in 100 µl of PBS for 3 h at 37°C and then blocked overnight at 4°C. One microgram of OmpL1 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 proteins were detected by the addition of an appropriate dilution of mouse antiserum that gives an OD₄₉₂ value of 1, determined by titration in 100 µl of PBS (1:1,600). Incubation proceeded for 1 h at 37°C, and after three washes with PBS-T, 100 µl of a 1:5,000 dilution of HRP-conjugated goat anti-mouse IgG in PBS was added per well and incubated for 1 h at 37°C. The wells were washed three times, and *o*-phenylenediamine (1 mg/ml) in citrate phosphate buffer (pH 5.0) plus 1 µl/ml H₂O₂ was added (100 ml per well). The reaction was allowed to proceed for 10 min and was interrupted by the addition of 50 µl of 8 M H₂SO₄ to the mixture. Readings were taken at 492 nm with a microplate reader (Multiskan EX; Thermo Fisher Scientific, Helsinki, Finland). For statistical analyses, the binding of the recombinant protein to ECM macromolecules was compared to its binding to all three negative controls by using Student's two-tailed *t* test, and the *P* value was determined by comparison to gelatin, which was used as the negative control for the following experiments. Binding was also confirmed by using HRP-

conjugated anti-His tag monoclonal antibodies previously titrated against the recombinant protein and used at a dilution that generates an OD₄₉₂ value of approximately 1.

K_D values for binding of OmpL1 to ECM and to serum components. First, ELISA plates were coated with 100 μ l of 10 μ g/ml ECM or serum components, which were allowed to adhere for 3 h at 37°C. Plates were then blocked overnight, and increasing concentrations of purified OmpL1 were added (100 μ l/well in PBS) and incubated for 2 h at 37°C. The assessment of bound protein was performed by incubation for 1 h at 37°C with the antiserum raised against the protein at the dilution of 1:1,600, followed by HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:5,000 in PBS) (Sigma). The ELISA data were used to calculate the equilibrium dissociation constant (K_D), according to a method described previously (37), based on the equation $A = A_{\max} [\text{protein}]/(K_D + [\text{protein}])$, where A is the absorbance at a given protein concentration, A_{\max} is the maximum absorbance for the ELISA plate reader (equilibrium), $[\text{protein}]$ is the protein concentration, and K_D is the equilibrium dissociation constant for a given absorbance at a given protein concentration (ELISA data point).

Antibody inhibition assay. We assessed the effect of anti-OmpL1 antibodies on the binding of the recombinant protein to laminin, plasma fibronectin, and plasminogen in a dose-dependent manner. As a control, preimmune serum was employed. Briefly, plates were coated with 1 μ g of each component and blocked with 10% nonfat dry milk. At the same time, 1 μ g of OmpL1 was incubated with different concentrations of antiserum raised in mice against the recombinant protein or preimmune serum (from 1:50 to 1:400 dilutions) for 2 h at 37°C. After that, the recombinant protein was allowed to interact with the coated component for 2 h at 37°C. After washing with PBS-T, HRP-conjugated anti-His tag monoclonal antibodies, previously titrated against the recombinant protein and used at a dilution that generates an OD₄₉₂ value of approximately 1, were added. The wells were washed three times, and *o*-phenylenediamine (1 mg/ml) in citrate phosphate buffer (pH 5.0) plus 1 μ l/ml H₂O₂ was added (100 ml per well). The reaction was allowed to proceed for 10 min and was interrupted by the addition of 50 μ l of 8 M H₂SO₄ to the mixture. Readings were taken at 492 nm in a microplate reader. For statistical analyses, the percent binding of the recombinant protein was compared to its binding in the treatment in which no anti-OmpL1 antiserum was added (100% binding) by Student's two-tailed *t* test.

Characterization of binding of OmpL1 to laminin and PLG. In order to evaluate the contribution of the sugar moiety to the laminin-OmpL1 interaction, microplates were coated with 1 μ g of laminin in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) and incubated for 16 h at 4°C. Wells were washed three times with the same buffer, and immobilized laminin was treated with different concentrations of sodium metaperiodate (5 to 100 mM) for 15 min at 4°C in the dark. After three washes with 50 mM sodium acetate buffer, wells were blocked with 200 μ l of PBS-T-10% (wt/vol) nonfat dry milk for 2 h at 37°C. The binding of OmpL1 (1 μ g per well in PBS) to periodate-treated laminin was assessed as described above. The effect of the ionic strength on the binding of OmpL1 to PLG was assessed by increasing the NaCl concentration from 137 mM, which is the concentration in PBS solution, to 437 mM. To determine the role of lysines in PLG-recombinant protein interactions, the lysine analog 6-aminocaproic acid (ACA) (Sigma-Aldrich), together with the recombinant protein at a final concentration of 2 mM or 20 mM, was added to the PLG-coated wells. The detection of bound protein was performed as described above.

Plasmin enzymatic activity assay. Ninety-six-well ELISA plates were coated overnight with 10 μ g/ml recombinant protein or BSA and Lsa63 (73), as a negative control, in PBS at 4°C. Plates were washed once with PBS-T and blocked for 2 h at 37°C with PBS plus 10% (wt/vol) nonfat dry milk. The blocking solution was discarded, and 100 μ l/well of 10 μ g/ml human PLG was added, followed by incubation for 2 h at 37°C. Wells were washed three times with PBS-T, and 4 ng/well of human urokinase-type PLG activator (uPA; Sigma-Aldrich) was then added. Subsequently, 100 μ l/well of the plasmin-specific substrate *D*-valyl-leucyl-lysine-*p*-nitroanilide dihydrochloride (Sigma-Aldrich) was added at a final concentration

of 0.4 mM in PBS. Plates were incubated overnight at 37°C, and substrate degradation was measured by taking readings at 405 nm.

Binding interference of OmpL1 with ECM and PLG. Ninety-six-well plates were coated with 100 μ l of 10 μ g/ml laminin, plasma fibronectin, or PLG in PBS overnight at 4°C; washed three times; and blocked with 10% (wt/vol) nonfat dry milk for 2 h at 37°C. Concomitantly, OmpL1 (1 μ g in 100 μ l of PBS) was incubated with increasing concentrations (0 to 1 μ g in 100 μ l of PBS) of the other components separately and then transferred onto the coated plates, which were then incubated for 2 h at 37°C. After four washes, recombinant protein binding was quantified by specific antibodies, as described above.

Inhibition of binding of live leptospire to laminin, plasma fibronectin, and PLG by OmpL1. ELISA plates were coated with laminin, plasma fibronectin, or PLG (1 μ g/well). The plates were washed and blocked with 10% nonfat dry milk in PBS-T for 2 h at 37°C. The blocking solution was discarded, and the wells were incubated with increasing concentrations of recombinant protein (0 to 1.5 μ M) for 2 h at 37°C. After three washes, 100 μ l/well of 4×10^7 live *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20 leptospire in low-salt PBS (containing 50 mM NaCl) was added for 90 min at 37°C. The unbound leptospire were washed with low-salt PBS, and the quantification of bound leptospire was performed indirectly by the detection of anti-LipL32 antibodies produced in mice (1:4,000); due to the fact that LipL32 is a major outer membrane leptospiral protein (24), the procedure was followed by the detection of HRP-conjugated anti-mouse IgG antibodies essentially as described previously by Barbosa et al. (4). Detection was performed by *o*-phenylenediamine (OPD), as described above.

Statistical analysis. All results are expressed as means \pm standard errors of the means (SEM). Student's paired *t* test was used to determine the significance of differences between means, and *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Cloning, expression, and purification. Oligonucleotides for PCR amplification (see Materials and Methods) were designed based on genome sequences of *L. interrogans* serovar Copenhageni, excluding the signal peptide. The amplified coding sequence was cloned into an *E. coli* pAE vector (57), and the protein was expressed with a 6 \times His tag at the N terminus. The recombinant protein was expressed in the bacterial pellet, in its insoluble form, as inclusion bodies (Fig. 1A, lane 4). We failed to obtain the protein in its soluble form, possibly due to its structure, which is predicted to have 10 β -sheet transmembrane segments (63). Protein was recovered from inclusion bodies after solubilization with 8 M urea. Purification was performed by metal-chelating chromatography after refolding for the removal of urea and was evaluated by SDS-PAGE, as shown in Fig. 1A, lane 6. The recombinant protein bands were confirmed by probing Western blots with polyclonal antibodies raised in mice against OmpL1 (Fig. 1B, lane 1) and with anti-His tag monoclonal antibodies (Fig. 1B, lane 3). The calculated 32.4-kDa molecular mass of the recombinant OmpL1 protein comprises the vector fusion plus the encoded amino acid sequence. The structural integrity of the purified protein was assessed by circular dichroism (CD) spectroscopy. The method evaluates the secondary structure content of protein, and it is an important datum to obtain after protein refolding. As depicted in Fig. 1C, the CD spectrum shows the minima at 215 to 220 nm and the maximum at approximately 196 nm, which is typical of the β -strand secondary structure content of the recombinant protein. The predominance of the OmpL1 β -strand was also confirmed by an analysis of the spectrum data by K2D2 software, which showed 34% β -strand content and 14% alpha-helix content (52). The data are in agreement with the structure of the native protein, which

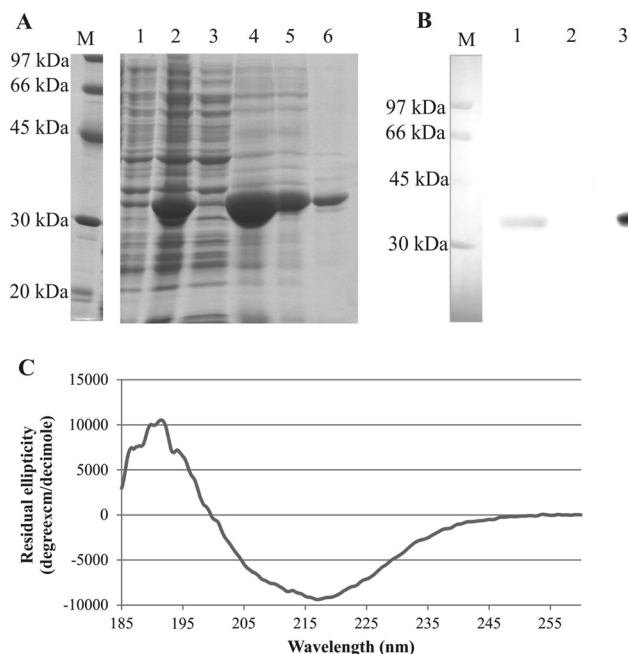


FIG 1 Expression, purification, and Western blotting of purified recombinant OmpL1. (A) Recombinant OmpL1 expression analysis by SDS-PAGE. Lanes: M, molecular mass protein marker; 1, noninduced total bacterial extract; 2, total bacterial cell lysates after induction; 3 and 4, soluble and insoluble (pellet) fractions of the induced culture, respectively; 5, flowthrough fraction; 6, purified recombinant protein in a Coomassie blue-stained gel. (B) Western blotting of the recombinant protein probed with pooled polyclonal antiserum raised in mice immunized with OmpL1 (lane 1) or PBS (lane 2) or with anti-His tag monoclonal antibodies (lane 3). (C) CD spectrum of the OmpL1 protein depicting a predominance of β -sheets in its secondary structure. The far-UV CD spectrum is presented as an average of five scans recorded from 185 to 260 nm.

was predicted previously to have a predominance of β -strands (59).

Genomic DNA and protein conservation among leptospiral strains. The integrity of genomic DNA was confirmed by the amplification of the 16S rRNA gene. A single band corresponding to the OmpL1 gene was observed for all pathogenic strains tested, while no band was found for genomic DNA of the saprophytic species *L. biflexa* (Fig. 2A). Protein expression and conservation among *Leptospira* strains were assessed with total protein extracts from the same pathogenic, high-passage-number, nonvirulent strains of *Leptospira*, used for genomic DNA conservation; the saprophytic *L. biflexa* serovar Patoc strain; and virulent, low-passage-number *L. interrogans* serovar Copenhageni strain FIOCRUZ L1-130 and *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Pomona Fromm. Cell extracts were gel fractionated, protein membranes were transferred, and Western blotting was performed by probing the membranes with polyclonal serum from mice immunized with OmpL1. The serological reactivity showed a conservation of OmpL1 epitopes in the main serovars of *L. interrogans* (Fig. 2B). However, with the two serovars of *L. borgpetersenii* (Fig. 2B, lanes 5 and 6), only weak protein bands were detected. No protein band was detected with *L. santarosai* serovar Shermani and with the saprophytic *L. biflexa* strain (Fig. 2B, lanes 9 and 11). Reactivity was also detected with both virulent *L. interrogans* strains employed (Fig. 2B, lanes 12 and 13). A multiple-sequence

alignment was performed with the CLUSTAL 2.1 program to compare OmpL1 with the sequences available in the GenBank database, and the resulting phylogram is depicted in Fig. 2C. The result clearly shows the high level of conservation of OmpL1 among leptospiral strains, the similarity/proximity with the sequences present in pathogenic strains, and the low level of similarity of the sequence present in saprophytic and intermediate-pathogenic strains (43), which are organized in a more distant branch. Contrary to the *in silico* analysis, we did not detect the OmpL1 protein in *L. santarosai* serovar Shermani in our experiments (Fig. 2B and C). This might be due to some sequence problems with the gene or because the analysis was performed with different isolates.

Evaluation of immunological responses elicited by OmpL1 in mice. The antibody immune responses induced by OmpL1 in mice were analyzed by an ELISA on a quantitative basis. As depicted in Fig. 3A, IgG1 and IgG2a antibodies against OmpL1 were found, with a predominance of the IgG1 isotype. The major Ig response was that of IgG, with a titer of 100,400; the IgM titer was 6,400 (data not shown), and IgA was not detected. Statistically significant values for lymphocyte proliferation were achieved with animals immunized with OmpL1 and stimulated with the recombinant protein ($P < 0.05$) (Fig. 3B), with an average stimulation index of 2.8. A high proliferation level was obtained when cells were treated with ConA, which was employed as a positive control for the experiment (not shown). The addition of OmpL1 to lymphocytes from animals that had not been primed with the recombinant protein produced nonsignificant levels of proliferation (data not shown). Supernatants of cultured spleen cells from OmpL1-immunized mice were analyzed for the presence of the cytokines IL-10, IL-4, IFN- γ , and TNF- α , selected to discriminate cellular Th1 (IFN- γ and TNF- α) and humoral Th2 (IL-10 and IL-4) immune responses (58, 65). The cytokine profiles obtained showed a predominance of IL-10 and IFN- γ , with both occurring at high levels (Fig. 3C and D) similar to those for the ConA positive control (not shown). A statistically significant cytokine level was obtained for the OmpL1-primed group when cells were stimulated with OmpL1 ($P < 0.001$ for IL-10 and $P < 0.0001$ for IFN- γ); a lower value, although statistically significant, was observed for the TNF- α level ($P < 0.05$) when the cells from the OmpL1-primed group were induced or not with the recombinant protein (Fig. 3E). In contrast, no IL-4 stimulation was achieved when spleen cells from animal groups under the same experimental conditions were compared (Fig. 3F). Measurements of the same parameters with spleen cells from control animals immunized with PBS and either stimulated or not with the recombinant protein produced negligible results (not shown).

Reactivity of OmpL1 with human and hamster leptospirosis serum samples. We have performed ELISAs to analyze whether OmpL1 is recognized by antibodies present in serum samples from cases of confirmed leptospirosis in humans and experimentally infected hamsters. We employed 32 paired samples from patients in the early (MAT negative) and convalescent (MAT positive) phases of the disease and 44 samples of MAT-positive sera from hamsters. Our data show that the recombinant protein was able to recognize specific IgG antibodies in 90% of the tested sera from infected hamsters (Fig. 4A). A high level of responders (75%) was obtained for IgG in human MAT-positive sera, while a total of 9% of serum samples presented IgG antibodies against OmpL1 in the early phase of the disease (MAT negative) (Fig. 4B). The cutoff

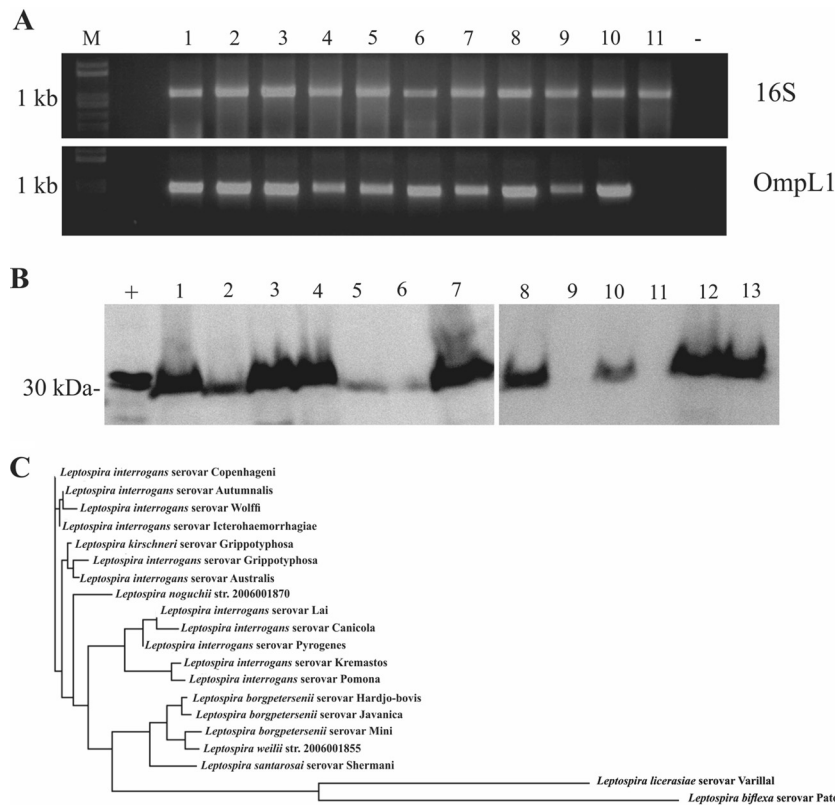


FIG 2 DNA and OmpL1 protein conservation among *Leptospira* strains. (A) Genomic DNAs of several species of *Leptospira* were used as the template for PCR amplification of the 16S rRNA (constitutive control) and OmpL1 genes. The negative control (–) denotes a reaction without a DNA template. (B) Leptospiral whole-cell lysates and recombinant OmpL1 (+) (used as a positive control) were separated by SDS-PAGE, transferred onto membranes, and probed with antiserum against the recombinant protein followed by peroxidase-conjugated anti-mouse IgG. Reactivity was detected by an ECL kit. Shown are data for *L. interrogans* serovars Copenhageni (lane 1), Canicola (lane 2), Icterohaemorrhagiae (lane 3), and Pomona (lane 4); *L. borgpetersenii* serovars Castellonis (lane 5) and Whitcombi (lane 6); *L. kirschneri* serovars Cynoptery (lane 7) and Grippotyphosa (lane 8); *L. santarosai* serovar Shermani (lane 9); *L. noguchii* serovar Panama (lane 10); and *L. biflexa* serovar Patoc (lane 11). For protein conservation, virulent *L. interrogans* serovar Copenhageni strain FIOCRUZ L1-130 (lane 12) and *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Pomona Fromm (lane 13) were also included. (C) Resulting phylogram of all sequence alignments performed by using CLUSTAL W2 showing the high level of sequence conservation among leptospiral strains, the proximity of OmpL1 proteins among pathogenic strains of *Leptospira*, and the intermediate and saprophytic strains in distant branches.

value calculated with healthy human sera was 0.374. Due to the nonspecific clinical symptoms of leptospirosis, we analyzed the reactivity of the recombinant OmpL1 protein with serum samples from patients with unrelated infectious diseases who did not have a history of leptospirosis, including dengue virus infection ($n = 13$), malaria ($n = 12$), Chagas' disease ($n = 20$), and HIV infection ($n = 15$). The reactivity obtained with OmpL1 and these serum samples was similar to that obtained with serum samples from healthy donors (Fig. 4B). The specificity of OmpL1 was calculated to be 100% for all unrelated diseases tested, except for dengue virus, for which the specificity was calculated to be 92.3%.

Adhesion of OmpL1 to ECM components. As native OmpL1 has surface-exposed domains (23, 54), we decided to evaluate whether this protein could mediate host colonization by adhering to extracellular matrix proteins. Thus, laminin, collagen type I, collagen type IV, cellular fibronectin, plasma fibronectin, ECM gel, elastin, and the control proteins gelatin, BSA, and fetuin were immobilized on 96-well microdilution plates, and recombinant protein attachment was assessed by an ELISA, as previously described (4). As shown in Fig. 5A, the OmpL1 protein exhibited statistically significant adhesiveness to laminin and plasma fibronectin ($P < 0.01$). The adherence of OmpL1 to ECM gel was

expected, as laminin is one of the components (see Materials and Methods). No statistically significant adhesiveness was observed with the OmpL1 protein when wells were coated with collagen types I and IV, cellular fibronectin, elastin, or control proteins. Binding was confirmed by performing a similar assay but using anti-His tag monoclonal antibodies (Fig. 5B). The interaction of OmpL1 with laminin and with plasma fibronectin was also assessed on a quantitative basis by fixing the ECM components and changing the protein concentrations, as depicted in Fig. 5C and D, respectively. A binding saturation level was achieved with a protein concentration of $\sim 5 \mu\text{M}$ for laminin and plasma fibronectin, with K_D values of $2,099.93 \pm 871.03 \text{ nM}$ and $1,239.23 \pm 506.85 \text{ nM}$, respectively. The role of the sugar moiety in laminin was also investigated by incubating this component with increasing concentrations of sodium metaperiodate. A reduction of 20% of the binding was found only with the highest concentration tested, suggesting that the carbohydrate moieties do not have a major role in the binding of OmpL1 to laminin (Fig. 5E). The effect of mouse anti-OmpL1 polyclonal serum on the interaction of the recombinant protein and ECM was also evaluated. A low antiserum dilution (1:50) almost abolished the binding of OmpL1 with laminin (90%), while a 73% binding reduction was obtained with fi-

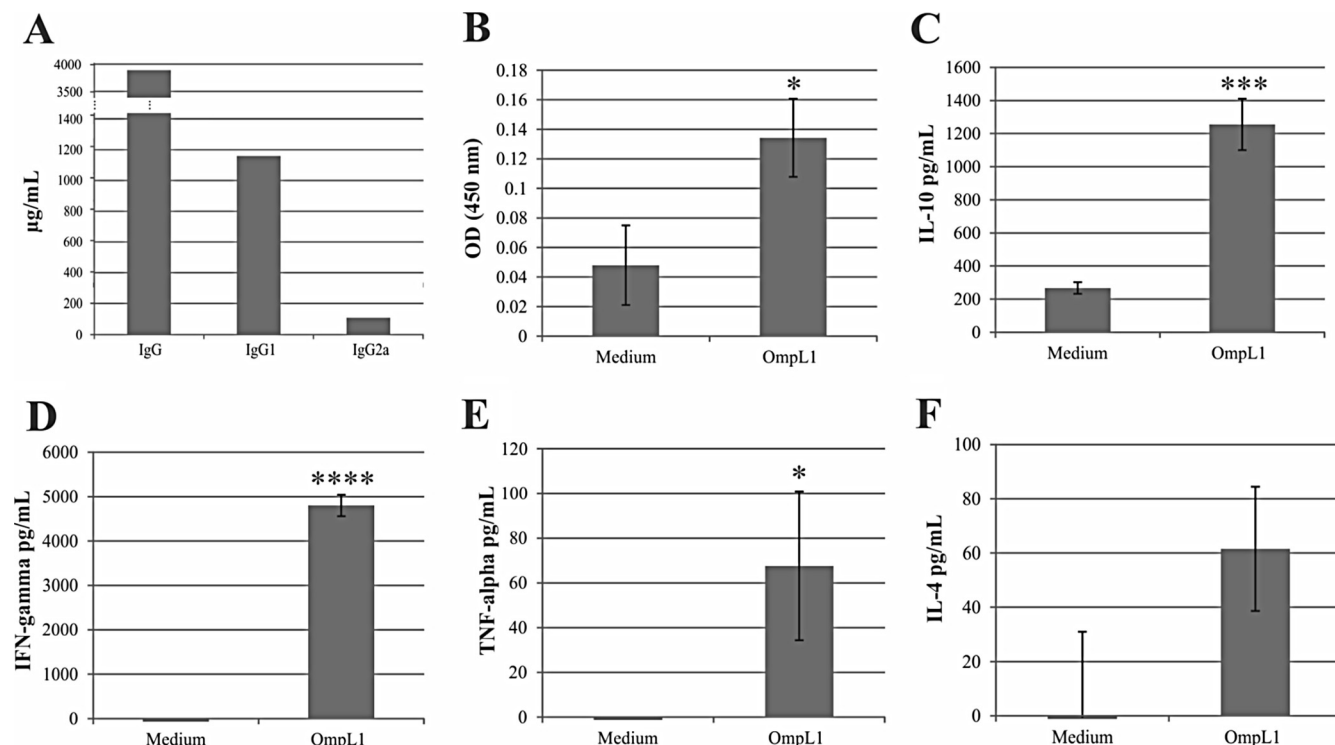


FIG 3 Evaluation of immune responses of BALB/c mice immunized with OmpL1. (A) Total IgG antibodies and subclasses in sera from BALB/c mice immunized with OmpL1 were determined. OD values were obtained from different pooled serum dilutions and compared against a concentration curve of total IgG, IgG1, and IgG2a. (B) The lymphocyte proliferation response was analyzed by using spleens of mice immunized with OmpL1. Cells were cultured, followed by a pulse with medium alone, ConA (5 µg/ml), or OmpL1 (5 µg/ml). Lymphocytes stimulated with medium alone were used as negative controls, and those stimulated with ConA were used as positive controls. The proliferative response was measured by a colorimetric BrdU ELISA. The data represent the mean OD values of three determinations \pm standard deviations from two independent experiments. For statistical analysis, OD values for the OmpL1-immunized group treated with the recombinant protein were compared with those for the OmpL1-immunized group treated with medium alone by the two-tailed *t* test (*, $P < 0.05$). Spleen cells were isolated and cultured in 24-well tissue culture plates, with each well containing 5×10^6 cells. (C to E) After 48 h, cell-free culture supernatants were collected, and levels of the cytokines IL-10 (C), IFN- γ (D), TNF- α (E), and IL-4 (F) were measured by a sandwich ELISA according to the manufacturer's instructions. For statistical analysis, concentration values for the OmpL1-immunized group pulsed with the recombinant protein were compared with those for the OmpL1-immunized group treated with medium alone by the two-tailed *t* test (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$).

bronectin (Fig. 5F). Preimmune serum at the same dilutions had only a moderate effect on the binding of the recombinant protein with ligands, with 21 and 17% reductions in binding for laminin and plasma fibronectin, respectively, reinforcing the interaction of OmpL1 and the two ECM components (Fig. 5F).

Recombinant leptospiral OmpL1 binds to human PLG. In our previous work, we have shown that leptospires bind PLG on their surface (77), and we have also described several proteins that are probably PLG receptors (73). Based on this assumption, we decided to evaluate whether OmpL1 can also adhere to human PLG *in vitro*. In addition, we investigated whether the recombinant protein can also bind factor H, human complement, and C4bp, as previously reported for other recombinant proteins (4, 5, 11, 16, 71). Our data show that OmpL1 binds to human PLG ($P < 0.01$), while no or a very low level of reactivity was detected with the other components and the control proteins (Fig. 6A). This binding was also confirmed by using anti-His monoclonal antibodies (Fig. 6B). The interaction between OmpL1 and PLG was also assessed on a quantitative basis, by keeping the PLG concentration constant and changing the protein concentration, as shown in Fig. 6C. A binding saturation level was reached with 2 µM OmpL1, with a K_D of 368.63 ± 121.23 nM. It is well known that PLG kringle domains frequently mediate interactions with

lysine residues of the bacterial receptors (32). These domains were shown previously to participate in the binding of PLG and intact live *L. interrogans* serovar Copenhageni strain L1-130 cells, since the derivative and analogue of lysine, ACA, almost totally inhibited binding (77). Based on these findings, the participation of lysine residues in the binding of the recombinant protein was evaluated by the addition of ACA to the assay mixture. As depicted in Fig. 6D, an increase of the NaCl concentration from 137 mM, which is the concentration in PBS solution, to 437 mM had no effect on the OmpL1-PLG binding, suggesting that ionic interactions were not important. In contrast, when 2 mM ACA was added to the reaction mixture, the binding of the protein to PLG was almost completely abolished ($P < 0.01$), strongly suggesting the participation of these domains in the OmpL1 interaction with PLG. We further evaluated the interaction of PLG with the recombinant protein by adding several dilutions of mouse anti-OmpL1 polyclonal serum to the binding reaction mixture. An inhibitory effect on the interaction of OmpL1 with PLG was observed, which was dependent on the serum dilution, being almost totally eliminated at the lowest serum dilution (86%), in contrast to the 17% binding reduction obtained with preimmune serum (Fig. 6E).

Plasmin generation from bound PLG. It was demonstrated previously that enzymatically active plasmin is generated by PLG

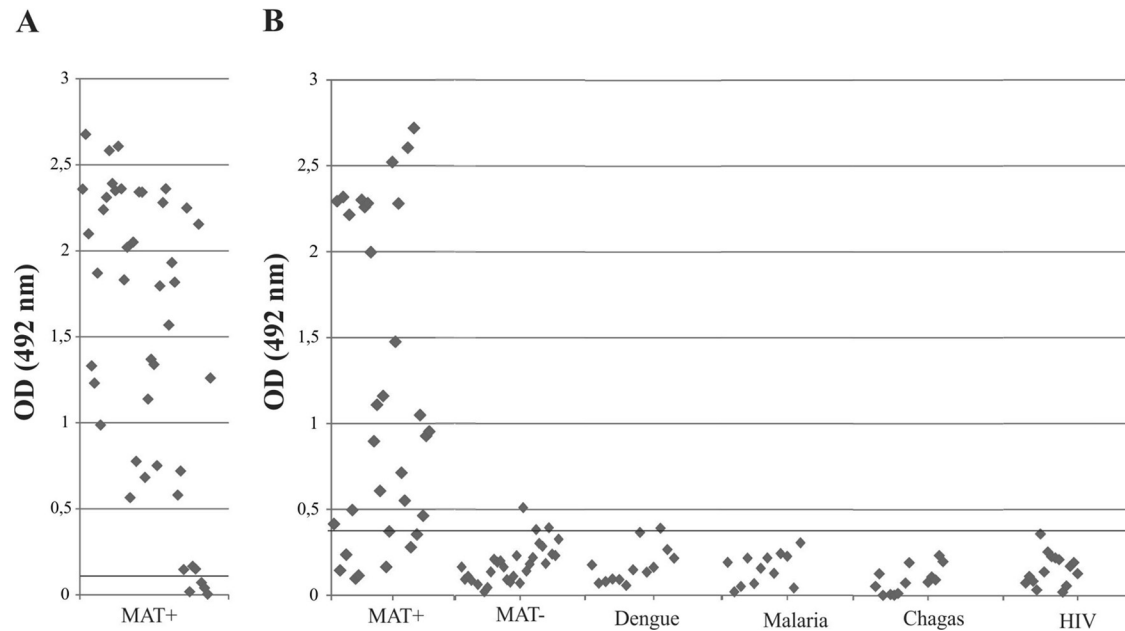


FIG 4 Recognition of OmpL1 by IgG antibodies in serum samples from hamsters, individuals diagnosed with leptospirosis, and individuals diagnosed with unrelated diseases. Positive sera (responders) were detected by an ELISA with the recombinant protein and serum samples from experimentally infected hamsters (A) and serum samples from leptospirosis patients in both the early (MAT⁻) and convalescent (MAT⁺) phases of the disease and from patients diagnosed with unrelated febrile diseases (B). The reactivity was evaluated as total IgG antibodies. The cutoff values are defined as the mean plus 3 standard deviations obtained with sera from 10 healthy individuals or 5 noninfected hamsters (horizontal bars).

bound to the surface of *L. interrogans* when its activator is present (77). To assess whether the PLG bound to OmpL1 generates proteolytic activity, as previously reported for other recombinant proteins (44, 49, 70, 71, 73), a microplate was coated with OmpL1, blocked, and then incubated with PLG. Unbound PLG was washed away, and a uPA (urokinase)-type PLG 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 PLG bound to the OmpL1 protein could be converted into plasmin, as indirectly demonstrated by the specific proteolytic activity (Fig. 6F). Control reaction mixtures lacking PLG, uPA, or the chromogenic substrate showed no significant enzymatic activity. The adhesin Lsa63, which is not a PLG-binding protein and therefore does not generate plasmin (73), was also included as a negative control (Fig. 6F).

Inhibition of *L. interrogans* attachment to laminin, PLG, or plasma fibronectin by OmpL1. It was reported previously that several recombinant proteins (4, 44, 49, 53) exhibit an inhibitory effect on the binding of leptospires to PLG and ECM macromolecules. We thus carried out similar experiments to evaluate whether OmpL1 has a similar effect on the adherence of leptospires to laminin, PLG, and plasma fibronectin. The results show that the addition of increasing concentrations of OmpL1 reduced the binding of leptospires to laminin, PLG, and plasma fibronectin. The reduction in the number of leptospires adhering to PLG was statistically significant with 0.1 μ M OmpL1 ($P < 0.05$), while for laminin, significance was reached with 1 μ M protein ($P < 0.05$), and for plasma fibronectin, significance was reached with 1.5 μ M protein ($P < 0.05$) (Fig. 7A). These results suggest that OmpL1 competes with the native leptospiral protein for the com-

ponent-binding sites. The experiment was performed in triplicate, and Fig. 7 shows one representative data set from two independent experiments.

Binding interference among OmpL1 ligands. As OmpL1 showed significant binding to PLG, laminin, and plasma fibronectin, we decided to evaluate whether these macromolecules compete for the same protein-binding sites. Thus, we evaluated the competition among the components in combinations of two each time. Increasing concentrations of laminin or PLG had no effect on the binding of OmpL1 to plasma fibronectin (Fig. 7B). Similarly, the addition of laminin or plasma fibronectin caused no changes in the binding of the recombinant protein to PLG (Fig. 7C). The binding of laminin to OmpL1 was not affected by the addition of plasma fibronectin (Fig. 7D), in contrast with the effect produced by the addition of PLG, which, unexpectedly, caused an increased interaction (Fig. 7D).

DISCUSSION

Leptospiral outer membrane proteins are the main focus of our research. Because of their location, these proteins may be involved in mechanisms of leptospiral pathogenesis and protective immunity. We reported that leptospires have the ability to adhere to laminin, cellular fibronectin, plasma fibronectin, and collagens I and IV (4), and to date, several leptospiral adhesin ECM-binding proteins have been identified. These proteins include the 36-kDa fibronectin-binding protein (45), LfhA/Lsa24 (4, 71), the LigA and LigB proteins (12, 36), Len family proteins (64), Lsa21 (2), LipL32 (27, 28), Lsa27 (38), Lp95 (3), TlyC (10), LipL53 (51), Lsa63 (74), OmpL37 (53), Lsa66 (49), Lsa20 (44), Lsa25, and Lsa33 (16). After adherence, leptospires rapidly disseminate to several organs, which is thought to be mediated by rapid translocation across host cell monolayers (7). Besides motility and che-

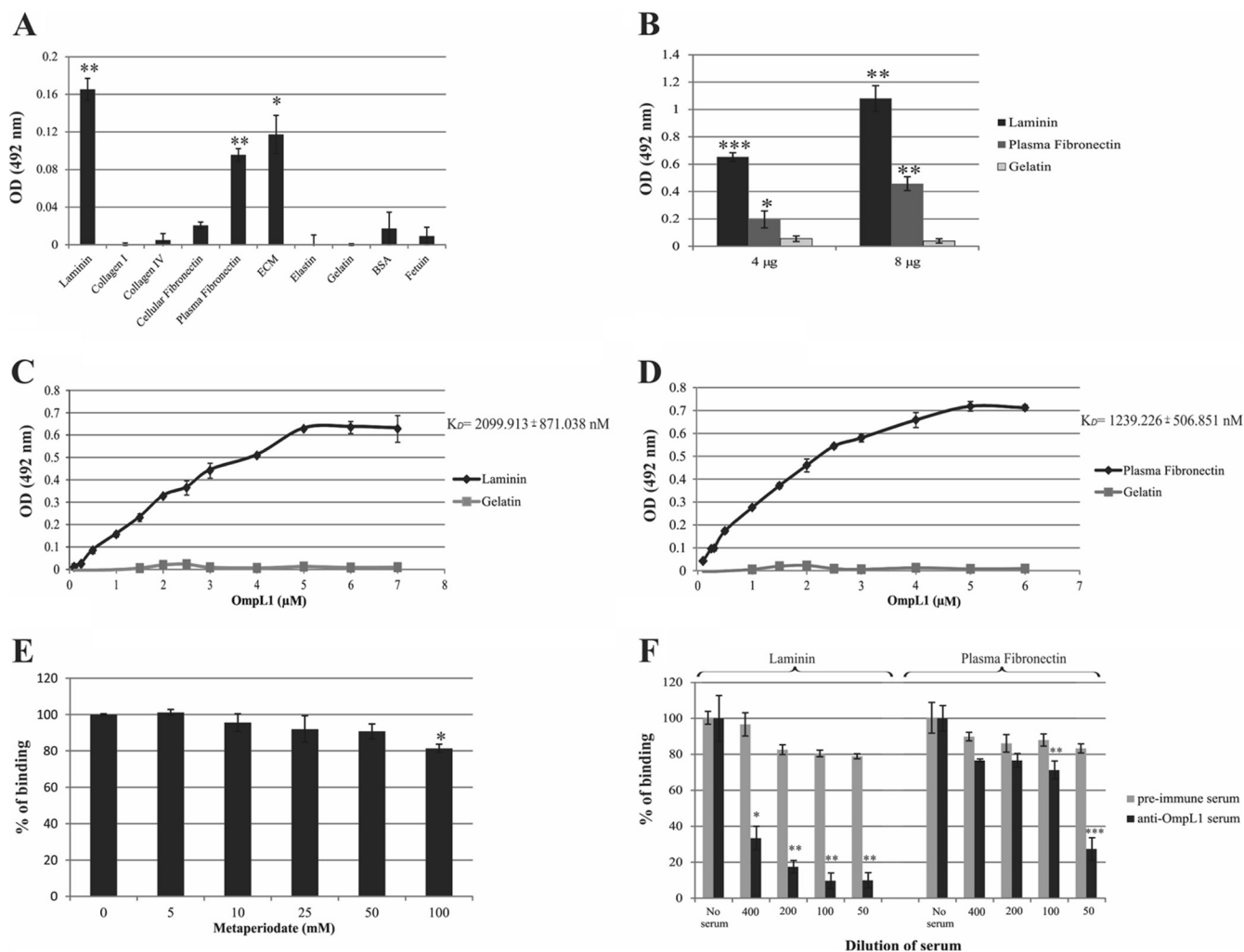


FIG 5 Binding of OmpL1 to ECM components. (A) Wells were coated with 1 µg of laminin, collagen type I, collagen type IV, cellular fibronectin, plasma fibronectin, ECM gel, elastin, and the control proteins gelatin, BSA, and fetuin. One microgram of the recombinant protein was added per well, and binding was measured by an ELISA. Data represent the means \pm the standard deviations from three independent experiments. For statistical analyses, the attachment of the recombinant protein to the ECM components was compared to its binding to all negative controls by the two-tailed *t* test, although the *P* value given here refers to comparisons with gelatin (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01). (B) Significant binding activity was confirmed by an ELISA employing anti-His tag monoclonal antibodies. Data represent the means \pm the standard deviations from three independent experiments. For statistical analyses, the attachment of the recombinant protein was compared to its binding to gelatin by the two-tailed *t* test (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001). (C and D) OmpL1 dose-dependent binding to laminin (C) and to plasma fibronectin (D). Each point represents values determined in triplicate, and data are expressed as the mean absorbance values at 492 nm \pm standard errors for each point. Gelatin was included as a negative control. The equilibrium dissociation constant (K_D) value is depicted for each ligand in panels C and D and was calculated based on ELISA data for the recombinant OmpL1 protein that reached equilibrium at a given concentration. (E) Immobilized laminin was treated with sodium metaperiodate (5 to 100 mM) for 15 min at 4°C in the dark, followed by the OmpL1 interaction. The mean absorbance values at 492 nm (\pm standard deviations from three independent experiments) were compared to those obtained with untreated laminin (0 mM). (F) Effect of preimmune and mouse polyclonal anti-OmpL1 serum dilutions upon the binding of OmpL1 with laminin or plasma fibronectin, compared to binding in the absence of antibodies (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01).

motaxis, *Leptospira* invasion may be mediated by a proteolytic activity capable of cleaving host cell membranes. Indeed, we have found that leptospires acquire host-derived plasmin by receptor-bound PLG and can degrade fibronectin and laminin (77a), which could help bacterial dissemination (73, 75, 77).

OmpL1 is a transmembrane outer membrane protein of *Leptospira* first described by Haake and colleagues (23). This protein was identified in pathogenic *Leptospira* spp. by proteomics (40, 46, 61, 76), exhibited a synergistic immunoprotective capacity in combination with LipL41 in the Golden Syrian hamster model of leptospirosis (25), and exhibited partial protective immunity as a

recombinant protein (17) or as a DNA vaccine (41), and it has been studied by several groups for its human and veterinary diagnostic capabilities (17, 20, 29, 47, 48, 56, 67, 78). In this work, we report that OmpL1, encoded by the gene LIC10973, is an adhesin of *Leptospira* that interacts with laminin and plasma fibronectin, is a PLG-binding receptor capable of generating plasmin, and is specifically recognized by antibodies in serum samples from cases of confirmed leptospirosis in humans.

The DNA coding sequence of OmpL1 is conserved among all serovars of *L. interrogans* and other pathogenic species tested but is absent in the saprophytic species *L. biflexa*. These results corrob-

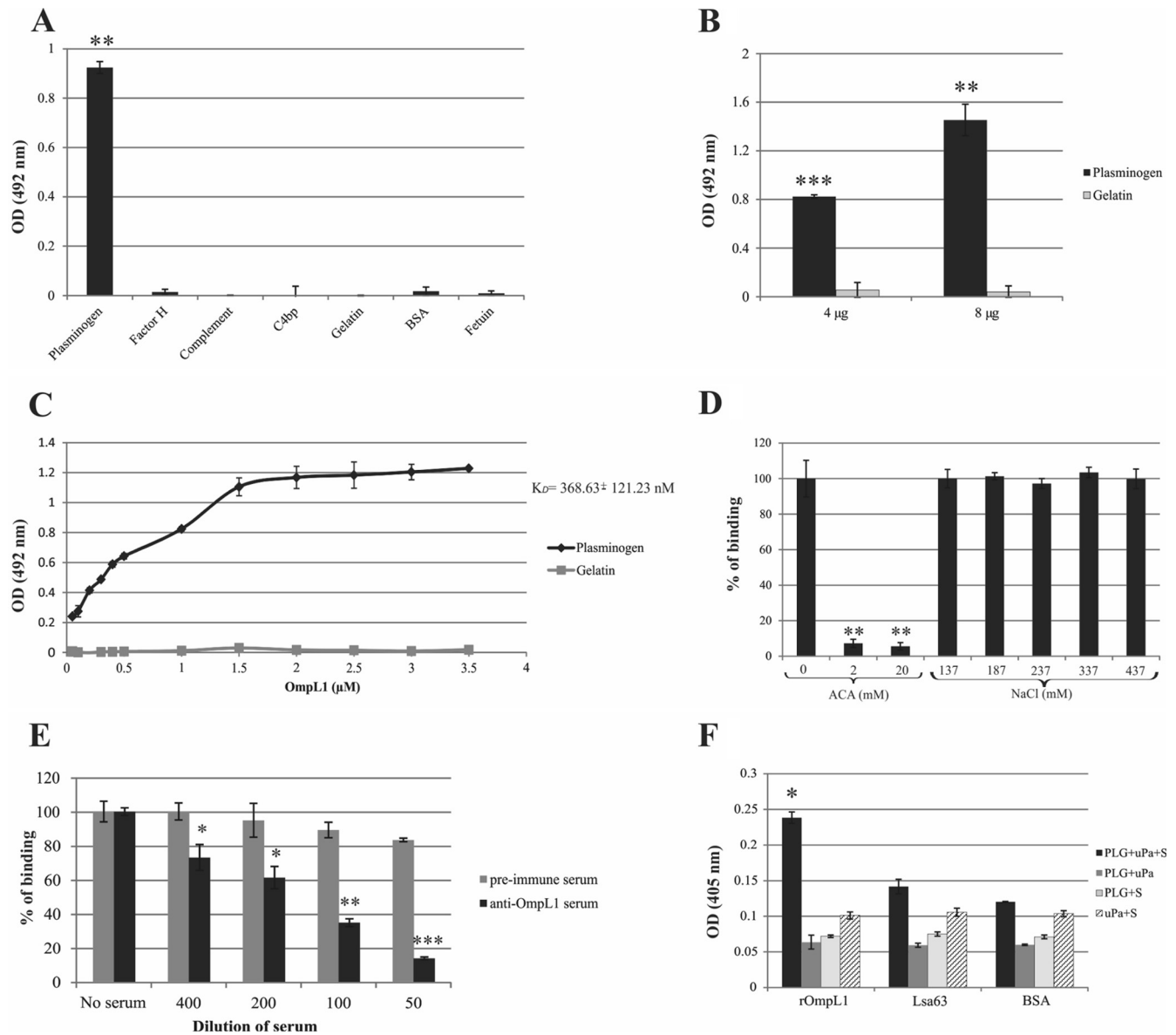


FIG 6 OmpL1 binds to PLG and generates active plasmin. (A) Wells were coated with 1 μ g of PLG, factor H, complement mix, C4bp, and the control proteins gelatin, BSA, and fetuin. One microgram of the recombinant protein was added per well, and binding was measured by an ELISA. Data represent the means \pm standard deviations from three independent experiments. For statistical analyses, the attachment of the recombinant protein to the serum components was compared to its binding to all negative controls by the two-tailed *t* test, although the *P* value given here is relative to a comparison against gelatin (**, $P < 0.01$). (B) Significant binding activity was confirmed by an ELISA employing anti-His monoclonal antibodies. Data represent the means \pm standard deviations from three independent experiments. For statistical analyses, the attachment of the recombinant protein was compared to its binding to gelatin by the two-tailed *t* test (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). (C) OmpL1 dose-dependent binding experiments. Each point represents data determined in triplicate, and results are expressed as the mean absorbance values at 492 nm \pm standard errors for each point. Gelatin was included as a negative control. The equilibrium dissociation constant (K_D) is depicted and was calculated based on ELISA data for the recombinant OmpL1 protein that reached equilibrium at a given concentration. (D) Binding of OmpL1 to PLG was carried out in the presence of an NaCl concentration from 137 to 437 mM and in presence or absence (no inhibition) of the lysine analogue 6-aminocaproic acid (ACA). Bound PLG was detected by specific antibodies and quantified. Bars represent the mean absorbances at 492 nm \pm standard deviations of triplicate determinations and are representative of two independent experiments. For statistical analyses, the attachment of the recombinant protein in the presence of ACA was compared to its binding to PLG without ACA (no inhibition) by the two-tailed *t* test (**, $P < 0.01$). (E) Effect of preimmune and mouse polyclonal anti-OmpL1 serum dilution upon binding of OmpL1 with PLG, compared to binding in the absence of antibodies (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). (F) Plasmin generation by PLG bound to recombinant protein, measured indirectly by the cleavage of the specific plasmin substrate, was assayed by a modified ELISA. The immobilized recombinant OmpL1 protein received the following treatment: PLG, uPA, and the specific plasmin substrate (PLG+uPA+S) or controls lacking one of the three components (PLG+uPA, PLG+S, and uPA+S). BSA and Lsa63 were employed as negative controls. Bars represent the mean absorbance values at 405 nm, as a measure of the relative substrate cleavage, \pm standard deviations from three replicates for each experimental group and are representative of two independent experiments. Statistically significant differences in comparison to BSA are shown (*, $P < 0.05$).

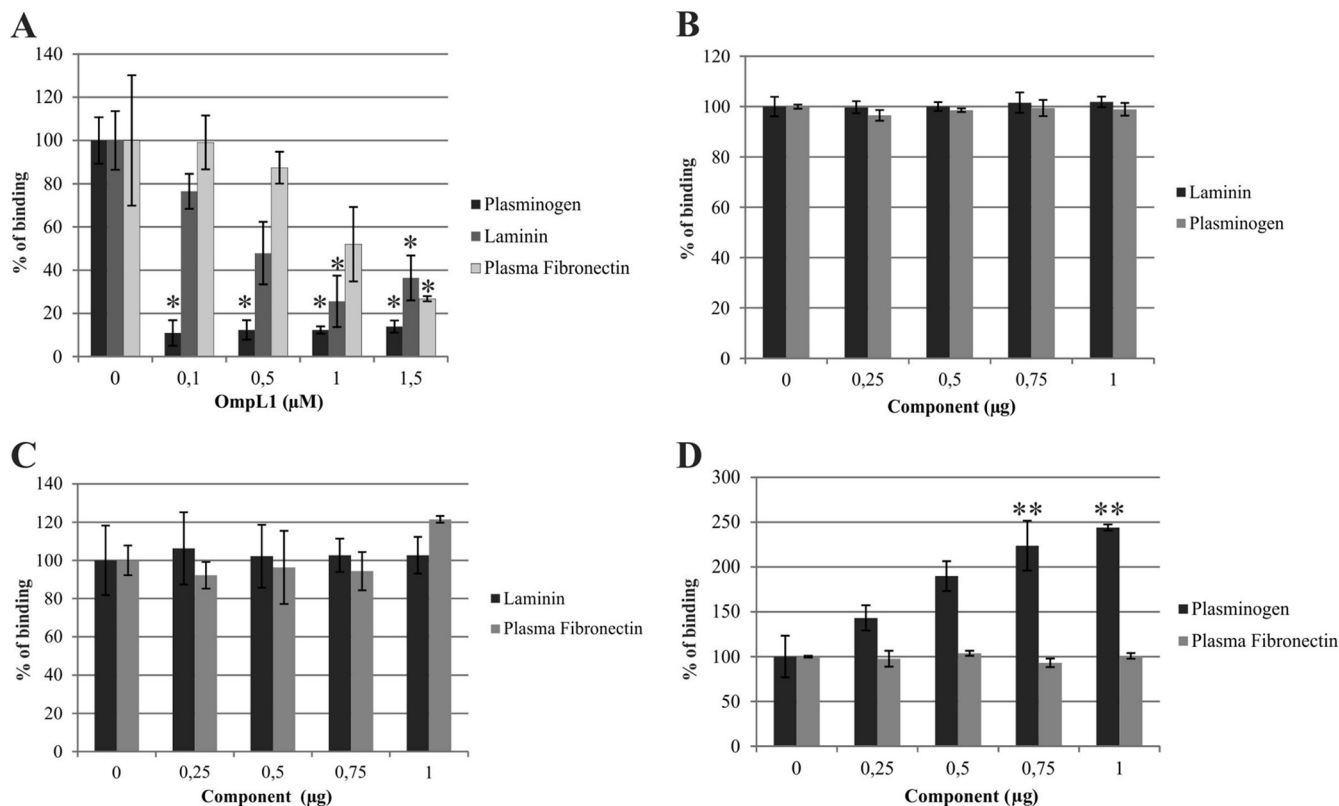


FIG 7 Inhibition of binding of leptospires to ECM or PLG by OmpL1 and competition assays of OmpL1 binding to ECM and PLG. (A) Laminin, plasma fibronectin, or PLG (1 μg/well) was adsorbed onto microtiter plates, followed by incubation with increasing concentrations of OmpL1 (0 to 1.5 μM) for 90 min at 37°C. After washes, live leptospires (100 μl/well of 4×10^7 leptospires) were added, and the quantification of bound leptospires was performed indirectly with anti-LipL32 antibodies produced in mice (1:4,000 dilution), followed by HRP-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 two independent experiments (*, $P < 0.05$). The effect of the component on every other interaction with OmpL1 was determined by competition assays with the addition of increasing concentrations of different components (0 to 1.00 μg in 100 μl PBS). (B) The effect of PLG or laminin on the binding of OmpL1 (10 μg/ml) to immobilized plasma fibronectin (10 μg/ml) was determined with the addition of increasing PLG or laminin concentrations (0 to 1.00 μg in 100 μl PBS). (C and D) Effect of laminin and plasma fibronectin on the binding of OmpL1 to immobilized PLG (C) and effect of PLG and plasma fibronectin on the binding of OmpL1 to immobilized laminin (D). Statistically significant interference was determined by the two-tailed t test (**, $P < 0.01$).

orate previously reported findings showing that this protein is expressed in high-passage-number pathogenic and low-passage-number virulent strains of *Leptospira* (23, 25, 26, 79). The LIC10973 gene was cloned and expressed in *E. coli* as a 32.4-kDa full-length recombinant protein, which comprises the native sequence of OmpL1 plus a 6×His tag at the N terminus. The purified protein exhibited a single major band in SDS-PAGE gels and was recognized by monoclonal anti-His tag antibodies and its homologous antibodies from mice immunized with the recombinant protein. An assessment of the secondary structure of the recombinant protein after the purification process was performed by CD spectroscopy, which showed a typical β -strand secondary structure content in the recombinant protein, which is in agreement with the predicted native structure of OmpL1, characterized as an outer membrane-spanning protein whose topological model contains 10 amphipathic transmembrane β -strands (23, 63).

Several researchers have suggested the importance of OmpL1 as a serological antigen for the diagnosis of leptospirosis in humans (17, 20, 47, 56, 67, 78) and canines (29, 48). Our data showed a high percentage of anti-OmpL1 IgG responders when serum samples from experimentally infected hamsters or MAT-positive human serum samples were used, which is in agreement with data

from previously reported studies. Moreover, the results corroborate previously reported findings that this protein is expressed during infection (6). Further evaluations of OmpL1 with human serum samples from patients with confirmed unrelated infectious diseases revealed a high specificity of this antigen, which reinforces the importance of OmpL1 as an antigen for the development of a leptospirosis diagnostic kit.

Lin and colleagues (35) previously evaluated combined B and T cell epitopes of OmpL1 and of LipL41 conserved regions for their capacities to promote immune responses in BALB/c mice and reported that the selected epitopes can induce a Th1 response. It had already been shown that OmpL1 is highly immunogenic in animal models, but these antibodies are probably not protective, because OmpL1 alone did not protect hamsters against challenge with virulent leptospires (25). The high levels of OmpL1 IgG antibodies detected in sera from immunized BALB/c mice were mainly of the IgG1 subclass, indicating a Th2-type response. Our data show that recombinant OmpL1 was also capable of activating a cell-mediated immune response, indicated by lymphocyte proliferation in OmpL1-immunized mice. Moreover, OmpL1 was capable of inducing both cellular and humoral immune response, as demonstrated by the levels of the cytokines IFN- γ , TNF- α (Th1),

and IL-10 (possibly Th2). These results might be explained in part by the effects exerted by the aluminum salt employed as an adjuvant, which is known to stimulate both Th1 and Th2 immune responses (42). In fact, Vernel-Pauillac and Merien (72) demonstrated previously that pathogenic leptospires can elicit Th1 responses together with antilipopolsaccharide antibodies in an animal model. Moreover, the protective immune mechanism of the LigA DNA vaccine in immunized animals was evaluated and was shown to be conferred by both Th1 and Th2 immune responses (19). It is worth mentioning that the recombinant LipL32 protein, a major leptospiral antigen, failed to confer protection against virulent bacteria in several challenge studies (9, 39). However, protection with this antigen was achieved when hamsters were immunized with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG (rBCG) expressing LipL32 (62). Recombinant BCG has the ability to elicit strong cellular as well as humoral immune responses (15). Thus, it is possible that not only humoral but also cellular immune responses are important for immunoprotection against leptospirosis. An understanding of the immune responses elicited by recombinant leptospiral antigens may provide new insights into the mechanisms of anti-*Leptospira* immunity and may facilitate the design of an improved recombinant-based vaccine.

OmpL1 is a surface-exposed protein that is expressed during infection. It is therefore possible that it may play a role in attachment to the host. Indeed, the OmpL1 protein exhibits extracellular matrix-binding properties. This protein binds laminin and plasma fibronectin, in contrast to the previously reported Lsa24 (4), Lsa27 (38), and Lsa20 (44) adhesins, which are laminin-binding adhesins, but similar to other previously reported adhesins, namely, Len family proteins (64), the LigA and LigB proteins (12), Lsa21 (2), LipL32 (27, 28), TlyC (10), OmpL37 (53), and Lsa66 (49), which showed broader-spectrum binding with ECM. The calculated K_D values for the binding of OmpL1 to laminin and to plasma fibronectin ($2,099.93 \pm 871.04$ and $1,239.23 \pm 506.85$ nM, respectively) are, however, higher than the K_D values obtained with Lsa66 and the same ECM components (55.4 ± 15.9 nM and 290.8 ± 11.8 nM) (49). Nevertheless, the kinetics of the dose dependence of each ligand with OmpL1 are specific, and saturable binding to immobilized components was observed, fulfilling the properties of a typical receptor-ligand interaction.

An interaction with host PLG, a key component of the host fibrinolytic system, has been shown for several invasive Gram-positive and Gram-negative bacteria (13, 68). We reported previously that *Leptospira* species were also capable of binding PLG and generating active plasmin on their surface (77). Moreover, we have demonstrated that the generation of this proteolytic activity makes virulent *L. interrogans* bacteria capable of degrading purified extracellular matrix fibronectin and laminin (77a), a step which may contribute to leptospiral invasiveness (76). In addition, we have identified proteins that act as leptospiral PLG receptors (73). OmpL1 also shows PLG-binding activity that seems to occur via PLG kringle domains, with a K_D of 368.63 ± 121.23 nM. This K_D value is of the same order of magnitude as the one reported previously for the adhesin Lsa20 (44) but higher than the ones reported previously for several recombinant proteins in our laboratory (73). As previously shown for other protein-PLG receptors (44, 49, 70, 71, 73), plasmin is actively generated in the presence of the urokinase activator by PLG-bound OmpL1. Thus, it is possible that this protein may contribute to leptospiral infectiveness. The low binding affinity of OmpL1 for ECM and PLG

could be compensated for by the high copy number reported previously for this protein in *L. interrogans* (40), which was shown to increase after 7 days of serum treatment (61). The fact that mouse polyclonal anti-OmpL1 serum had a strong reduction effect on the binding of OmpL1 with laminin, plasma fibronectin, and PLG, along with the fact that preimmune serum had only a moderate effect, strengthens the data for the reactivity between the recombinant protein and these ligands. No interference of the binding of OmpL1 with these ligands was observed, except for the increased binding effect produced by the increased PLG concentration on the binding of recombinant protein to laminin, suggesting that PLG is probably binding directly to immobilized laminin. Indeed, the interaction of laminin with PLG was reported previously (60). OmpL1 exhibited an inhibitory effect on the binding of intact *L. interrogans* to immobilized laminin, plasma fibronectin, or PLG, as was previously observed for the ECM- and PLG-interacting proteins Lsa24 (4), Lsa63 (74), LigA/LigB (12), OmpL37 (53), and Lsa20 (44).

In conclusion, in this work, we report for the first time that OmpL1 is an ECM- and PLG-binding protein of *Leptospira* spp. The interaction of OmpL1 with PLG in the presence of a host activator can generate plasmin, rendering the bacteria with proteolytic activity capable of degrading host cell membranes. Thus, as an ECM- and PLG-binding protein, OmpL1 may promote the attachment of the bacteria to mammalian hosts and may help the leptospires to disseminate during the infection process. The high percentage of human leptospirosis (MAT-positive) responders associated with the specificity of the IgG antibody response to OmpL1 among serum samples from patients with unrelated febrile diseases such as dengue virus, malaria, HIV, and Chagas' disease strengthens the potential of OmpL1 as a diagnostic marker for leptospirosis. OmpL1 promotes the proliferation of lymphocytes and activates both Th1 and Th2 cytokines from immunized BALB/c mice. It is conceivable that OmpL1 administered with an adequate immune modulator might exhibit protective activity against lethal challenges.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FAPESP, CNPq, and Fundação Butantan, Brazil; L.G.V.F. and M.L.V. have scholarships from FAPESP (Brazil).

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Adler B, de la Pena Moctezuma A. 2009. Leptospira and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140:287–296.
- Atzingen MV, et al. 2008. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC Microbiol.* 8:70. doi:10.1186/1471-2180-8-70.
- Atzingen MV, et al. 2009. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. *J. Infect.* 59:264–276.
- Barbosa AS, et al. 2006. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infect. Immun.* 74:6356–6364.
- Barbosa AS, et al. 2010. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. *Infect. Immun.* 78:3207–3216.
- Barnett JK, et al. 1999. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect. Immun.* 67:853–861.
- Barocchi MA, Ko AI, Reis MG, McDonald KL, Riley LW. 2002. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect. Immun.* 70:6926–6932.

8. Bharti AR, et al. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* 3:757–771.
9. Branger C, et al. 2005. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infect. Immun.* 73:4062–4069.
10. Carvalho E, et al. 2009. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. *FEBS Lett.* 583:1381–1385.
11. Castiblanco-Valencia MM, et al. 2012. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *J. Infect. Dis.* 205:995–1004.
12. Choy HA, et al. 2007. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect. Immun.* 75:2441–2450.
13. Coleman JL, Benach JL. 1999. Use of the plasminogen activation system by microorganisms. *J. Lab. Clin. Med.* 134:567–576.
14. de la Pena-Moctezuma A, Bulach DM, Kalambaheti T, Adler B. 1999. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. *FEMS Microbiol. Lett.* 177:319–326.
15. Dennehy M, Williamson AL. 2005. Factors influencing the immune response to foreign antigen expressed in recombinant BCG vaccines. *Vaccine* 23:1209–1224.
16. Domingos RF, et al. 2012. Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions. *BMC Microbiol.* 12:50. doi:10.1186/1471-2180-12-50.
17. Dong H, et al. 2008. Characterization of the ompL1 gene of pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. *BMC Microbiol.* 8:223. doi:10.1186/1471-2180-8-223.
18. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis, 2nd ed. MediSci, Melbourne, Australia.
19. Faisal SM, et al. 2008. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. *Vaccine* 26:277–287.
20. Flannery B, et al. 2001. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 39:3303–3310.
21. Galen RS, Gambino SR. 1975. Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis. John Wiley & Sons, Inc, New York, NY.
22. Gruber A, Zingales B. 1995. Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *Bio-techniques* 19:28, 30.
23. Haake DA, et al. 1993. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J. Bacteriol.* 175:4225–4234.
24. Haake DA, et al. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect. Immun.* 68:2276–2285.
25. Haake DA, et al. 1999. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect. Immun.* 67:6572–6582.
26. Haake DA, et al. 2004. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J. Bacteriol.* 186:2818–2828.
27. Hauk P, et al. 2008. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect. Immun.* 76:2642–2650.
28. Hoke DE, Egan S, Cullen PA, Adler B. 2008. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect. Immun.* 76:2063–2069.
29. Iwamoto E, et al. 2009. Nationwide survey of *Leptospira* antibodies in dogs in Japan: results from microscopic agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Med. Sci.* 71:1191–1199.
30. Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD, Jr, Riley LW. 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 354:820–825.
31. Koizumi N, Watanabe H. 2005. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *J. Postgrad. Med.* 51:210–214.
32. Lahteenmaki K, Kuusela P, Korhonen TK. 2001. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:531–552.
33. Larkin MA, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948.
34. Levett PN. 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:296–326.
35. Lin X, Sun A, Ruan P, Zhang Z, Yan J. 2011. Characterization of conserved combined T and B cell epitopes in *Leptospira interrogans* major outer membrane proteins OmpL1 and LipL41. *BMC Microbiol.* 11:21. doi:10.1186/1471-2180-11-21.
36. Lin YP, Chang YF. 2007. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362:443–448.
37. Lin YP, et al. 2009. Repeated domains of *Leptospira* immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. *J. Biol. Chem.* 284:19380–19391.
38. Longhi MT, et al. 2009. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. *J. Med. Microbiol.* 58:1275–1282.
39. Lucas DS, et al. 2011. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. *Vaccine* 29:3413–3418.
40. Malmstrom J, et al. 2009. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature* 460:762–765.
41. Maneewatch S, et al. 2007. OmpL1 DNA vaccine cross-protects against heterologous *Leptospira* spp. challenge. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 25:75–82.
42. Marrack P, McKee AS, Munks MW. 2009. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev.* 9:287–293.
43. Matthias MA, et al. 2008. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a Rattus species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2:e213. doi:10.1371/journal.pntd.0000213.
44. Mendes RS, et al. 2011. The novel leptospiral surface adhesin Lsa20 binds laminin and human plasminogen and is probably expressed during infection. *Infect. Immun.* 79:4657–4667.
45. Merien F, Truccolo J, Baranton G, Perolat P. 2000. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. *FEMS Microbiol. Lett.* 185:17–22.
46. Nally JE, et al. 2005. Purification and proteomic analysis of outer membrane vesicles from a clinical isolate of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Proteomics* 5:144–152.
47. Natarajaseenivasan K, et al. 2008. Serodiagnosis of severe leptospirosis: evaluation of ELISA based on the recombinant OmpL1 or LipL41 antigens of *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 102:699–708.
48. Okuda M, et al. 2005. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine *Leptospira* antibodies using recombinant OmpL1 protein. *J. Vet. Med. Sci.* 67:249–254.
49. Oliveira R, et al. 2011. Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PLoS One* 6:e21962. doi:10.1371/journal.pone.0021962.
50. Oliveira TR, et al. 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.
51. Oliveira TR, et al. 2010. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. *Microbes Infect.* 12:207–217.
52. Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA. 2008. K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Struct. Biol.* 8:25. doi:10.1186/1472-6807-8-25.
53. Pinne M, Choy HA, Haake DA. 2010. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4:e815. doi:10.1371/journal.pntd.0000815.
54. Pinne M, Haake DA. 2009. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. *PLoS One* 4:e6071. doi:10.1371/journal.pone.0006071.
55. Plank R, Dean D. 2000. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect.* 2:1265–1276.
56. Qiu XF, Xu HF, Guo ZQ, Wang J, Yan J. 2008. Establishment and application of ELISAs based on rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 fusion antigen of *Leptospira interrogans*. *Zhejiang Da Xue Xue Bao* 37:592–598. (In Chinese.)
57. Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. 2004. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37:1103–1109.

58. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. 2009. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* 30:23–32.
59. Rost B, Yachdav G, Liu J. 2004. The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res.* 32:W321–W326. doi:10.1093/nar/gkh377.
60. Salonen EM, Zitting A, Vaheri A. 1984. Laminin interacts with plasminogen and its tissue-type activator. *FEBS Lett.* 172:29–32.
61. Schmidt A, et al. 2011. Absolute quantification of microbial proteomes at different states by directed mass spectrometry. *Mol. Syst. Biol.* 7:510. doi:10.1038/msb.2011.37.
62. Seixas FK, et al. 2007. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine* 26:88–95.
63. Shang ES, et al. 1995. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect. Immun.* 63:3174–3181.
64. Stevenson B, et al. 2007. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS One* 2:e1188. doi:10.1371/journal.pone.0001188.
65. Storni T, Kundig TM, Senti G, Johansen P. 2005. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57:333–355.
66. Studier FW. 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219:37–44.
67. Sun A, Wang Y, Du P, Wu S, Yan J. 2011. A sensitive and specific IgM-ELISA for the serological diagnosis of human leptospirosis using a rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 fusion protein. *Biomed. Environ. Sci.* 24: 291–299.
68. Sun H. 2006. The interaction between pathogens and the host coagulation system. *Physiology (Bethesda)* 21:281–288.
69. Turner LH. 1970. Leptospirosis. 3. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 64:623–646.
70. Verma A, et al. 2010. Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infect. Immun.* 78:2053–2059.
71. Verma A, et al. 2006. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 74:2659–2666.
72. Vernel-Pauillac F, Merien F. 2006. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 74:4172–4179.
73. Vieira ML, et al. 2010. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. *PLoS One* 5:e11259. doi:10.1371/journal.pone.0011259.
74. Vieira ML, et al. 2010. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. *J. Infect.* 60:52–64.
75. Vieira ML, de Moraes ZM, Vasconcelos SA, Romero EC, Nascimento AL. 2011. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. *Microb. Pathog.* 51: 360–365.
76. Vieira ML, Pimenta DC, de Moraes ZM, Vasconcelos SA, Nascimento AL. 2009. Proteome analysis of *Leptospira interrogans* virulent strain. *Open Microbiol. J.* 3:69–74.
77. Vieira ML, Vasconcelos SA, Goncalves AP, de Moraes ZM, Nascimento AL. 2009. Plasminogen acquisition and activation at the surface of *Leptospira* species lead to fibronectin degradation. *Infect. Immun.* 77:4092–4101.
- 77a. Vieira ML, Atzingen MV, Oliveira R, Mendes RS, Domingos RF, Vasconcelos SA, Nascimento AL. Plasminogen binding proteins and plasmin generation on the surface of *Leptospira* spp. - the contribution to the bacteria-host interactions. *J. Biomed. Biotechnol.*, in press.
78. Zhang XY, et al. 2005. Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospire. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 37:649–656.
79. Zuerner R, Haake D, Adler B, Segers R. 2000. Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2:455–462.