

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Daniele de Oliveira Freitas

**Avaliação do bloqueio de transportadores de ácidos graxos no
metabolismo de *L. interrogans* por anticorpos policlonais**

São Paulo
2020

Daniele de Oliveira Freitas

**Avaliação do bloqueio de transportadores de ácidos graxos no metabolismo
de *L. interrogans* por anticorpos policlonais**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para a saúde: Vacinas e Biofármacos.

Orientador (a): Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento

Coorientador (a): Felipe José Passalia

São Paulo

2020

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Freitas, Daniele

Avaliação do bloqueio de transportadores de ácidos graxos no metabolismo de *L. interrogans* por anticorpos policlonais / Daniele Freitas; orientador Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento. – São Paulo, 2020.

28 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Biotecnologia para a saúde: Vacinas e Biofármacos.

1. Leptospira. 2. Leptospirose. 3. Proteína recombinante. I. Nascimento, Ana Lucia do. II. Instituto Butantan. III. Curso de Especialização em Biotecnologia para a saúde: Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

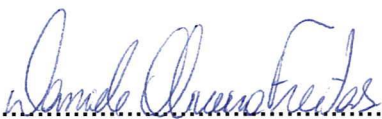
AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Daniele de Oliveira Freitas, aluna do curso **Biotechnologia para a saúde: Vacinas e Biofármacos** autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.


Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 24 de janeiro de 2020.



Aluno(a): Daniele de Oliveira Freitas



De acordo: Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento
Orientador(a): Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento

RESUMO

FREITAS, Daniele. Avaliação do bloqueio de transportadores de ácidos graxos no metabolismo de *L. interrogans* por anticorpos policlonais. 2020. 28 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a saúde: Vacinas e Biofármacos) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

A leptospirose é uma zoonose emergente amplamente distribuída de interesse humano e veterinário. Em áreas urbanas, os roedores desempenham o papel de principais reservatórios da doença por permitirem a colonização das bactérias do gênero *Leptospira* nos túbulos renais proximais e as excretarem vivas na urina. Em decorrência do amplo espectro de sintomas que o paciente pode apresentar, aliado a um ineficiente diagnóstico da doença, o número de casos no mundo permanece subestimado. Não há vacina eficaz até o momento. A identificação de proteínas da membrana externa conservadas entre estirpes patogênicas são os principais alvos de pesquisa para elucidar os mecanismos de patogenicidade. Deste modo, diversos estudos têm buscado caracterizar e identificar as proteínas de superfície que sejam antigênicas e presentes nos diversos sorovares de *L. interrogans*. A partir do genoma sequenciado de *L. interrogans*, o gene LIC12524 foi analisado *in silico* apresentando uma conformação de β -barril, com uma região transmembrana. Foram criadas duas construções de partes da proteína escolhidas com base em seus epítomos ligantes de célula B, EP1 e EP2. Os genes foram amplificados e clonados no vetor pAE. As proteínas EP1 e EP2 foram purificadas a partir da fração solúvel e insolúvel, respectivamente, por cromatografia de afinidade com metal. As proteínas recombinantes foram inoculadas em camundongos para avaliação da sua atividade imunogênica e obtenção de soros imunes. Estes soros foram avaliados quanto à reatividade com anticorpos em soros de pacientes diagnosticados com a doença, onde se mostraram reativos, porém pouco imunogênicos. Os resultados da qPCR, comparando a expressão da proteína em cepas virulenta e atenuada, mostraram que a expressão relativa foi aproximadamente 45 vezes mais alta na cepa virulenta.

Palavras-chave: *Leptospira*. Leptospirose. Proteína recombinante.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 Geral	4
2.2 Específicos	4
3 METODOLOGIA	5
3.1 Organismos e vetores.....	5
3.2 Análise de bioinformática.....	5
3.3 Extração de DNA genômico	6
3.4 Amplificação por PCR do gene	7
3.5 Clonagem no vetor pAE.....	8
3.6 Expressão de proteínas recombinantes.....	9
3.7 Purificação das proteínas recombinantes	11
3.8 Extração de RNA e síntese de cDNA	12
3.9 PCR em tempo real.....	12
3.10 Obtenção de anticorpos policlonais das proteínas recombinantes	13
3.11 Titulação de Anticorpos.....	13
3.12 Detecção de anticorpo IgG em soro de humanos diagnosticados com leptospirose em fase inicial e fase convalescente da doença	14
3.13 Avaliação da interação de anticorpos policlonais com <i>Leptospira</i>.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 Análise de Bioinformática do gene selecionado	15
4.2 Amplificação e Clonagem.....	17
4.3 Expressão da proteína recombinante.....	20
4.4 Purificação e diálise da proteína recombinante	22

4.5 Avaliação da imunogenicidade da proteína recombinante e titulação de anticorpos	23
4.6 Reatividade com o soro de pacientes diagnosticados com leptospirose....	25
4.7 Avaliação dos transcritos em <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni em estirpes atenuadas e cultura e virulentas	26
4.8 Avaliação da interação de anticorpos policlonais com <i>L. interrogans</i>	27
5 CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

As leptospiras são bactérias espiroquetas bastante móveis, aeróbias estritas, com um tamanho entre 0,10 a 0,15 µm de diâmetro e de 6 a 12 µm de comprimento. Possuem suas extremidades terminadas em gancho e dois flagelos periplasmáticos, os quais as diferenciam de outras espiroquetas (Levett, 2001). Elas apresentaram lipopolissacarídeos na membrana externa, classificando-as como Gram-negativas (Faine *et al.*, 1999; Haake, 2000; Li *et al.*, 2000). Sua membrana plasmática também está associada a uma camada espessa de peptidoglicanos, característica de bactérias Gram-positivas, dificultando sua visualização através do método de coloração de Gram, portanto, o método padrão utilizado é a microscopia de campo escuro ou microscopia eletrônica. A temperatura ótima de crescimento das leptospiras em meio de cultura varia de 28 a 30°C (Faine *et al.*, 1999; Adler e De La Peña Moctezuma, 2010; Levett, 2001).

O gênero *Leptospira*, pertencente à família *Leptospiraceae*, era dividido em patogênicas e saprófitas, respectivamente *L. interrogans* e *L. biflexa* (Johnson e Faine, 1984). Atualmente há duas classificações, uma genética e outra sorológica, baseada na estrutura heterogênea do carboidrato dos lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa. Na classificação genética são descritas mais de 64 espécies, sendo divididas em patogênicas; intermediárias, as quais podem causar ou não a doença com sintomas brandos e as saprófitas, de vida livre e não infecciosas (Brenner *et al.*, 1999; Bharti *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2009; Vincent, 2019; Bourhy *et al.*, 2014). Na classificação sorológica, de acordo com o teste de microaglutinação (MAT), baseado na variedade antigênica do LPS (sorovares) e nos antígenos em comum (sorogrupos), foram contabilizados mais de 300 sorovares agrupados em 24 sorogrupos. (Faine *et al.*, 1999; Fouts *et al.*, 2016; Picardeau, 2017). Esta classificação é complementar a classificação genética, auxiliando em estudos epidemiológicos e de distribuição geográfica das espécies (Ko *et al.*, 2009).

A leptospirose humana é causada pelas bactérias patogênicas pertencentes ao gênero *Leptospira* (Faine *et al.* 1999). Esta é uma doença negligenciada considerada uma das principais doenças infecciosas emergentes, sendo endêmica em regiões tropicais e subtropicais, onde as condições para transmissão são particularmente favoráveis (Costa *et al.*, 2015). Em áreas urbanas, os roedores domésticos, em particular, *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*, desempenham o papel

de principal reservatório da doença por serem carreadores assintomáticos das leptospirosas, as quais colonizam seus túbulos renais proximais e são excretadas na urina. A infecção pode ocorrer através de cortes, abrasões na pele ou membranas mucosas quando em contato direto com urina de animais infectados ou indiretamente por meio de água e solo contaminados (Levett, 2001).

Nos países em desenvolvimento, a leptospirose é uma doença associada a péssimas condições sanitárias e enchentes. Contudo, em países desenvolvidos é uma doença ocupacional associada a atividades profissionais de trabalhadores dos serviços de água, esgoto, lixeiros e tratadores de animais e também é associada a esportes aquáticos e recreação (Faine *et al.* 1999). Além disso, a leptospirose apresenta importância econômica, já que numerosos hospedeiros animais (selvagens e domésticos), como gado, podem contrair a doença, causando custos econômicos para pecuária industrial (Elis, 2014).

Os humanos são considerados os hospedeiros acidentais e terminais das leptospirosas. Os sintomas da infecção variam de acordo com o sorovar infectante, idade do hospedeiro e sua situação de saúde. Os mais frequentes associados à doença variam desde uma infecção subclínica caracterizada por febre, calafrio, cefaleia e mialgia, podendo evoluir para formas mais severas, como a Síndrome de Weil, caracterizada por icterícia, hemorragias, falência renal e falência múltipla de órgãos, acometendo de 5 a 15% dos casos, com taxas de mortalidade entre 5 e 40% ou a síndrome hemorrágica pulmonar (SHP), caracterizada principalmente por sangramento intenso dos pulmões e dano tecidual agudo, com taxas de mortalidade de 30 a 70% (McBride *et al.*, 2005).

No Brasil a leptospirose é uma doença de notificação compulsória, com mais de 40 mil casos confirmados e uma taxa de óbito de 9% no período de 2009 a julho de 2019, sendo as regiões Sul e Sudeste mais afetadas. Acredita-se ainda que os dados sejam subestimados dadas as dificuldades do diagnóstico já que os sintomas brandos podem ser facilmente confundidos com outras doenças febris como dengue, gripe e malária (Werts e Vernel-Pauillac, 2018). O método diagnóstico indicado pela OMS é a sorologia, através do teste de aglutinação microscópica (MAT) (Faine *et al.*, 1999). Embora este método apresente inúmeras desvantagens, tais como, baixa sensibilidade na detecção da fase inicial da doença, necessidade do cultivo em laboratório de diferentes sorovares e difícil interpretação de resultados devido à reatividade cruzada, o teste ainda é considerado padrão para detecção de

anticorpos nas amostras de soros de pacientes. Sendo assim, medidas profiláticas para o controle leptospirose são essenciais, como a vacinação.

As primeiras vacinas testadas, denominadas de bacterinas, são constituídas basicamente por uma suspensão de leptospiros inativadas ou mortas, as quais podem causar efeitos adversos (Faine *et al.*, 1999). Na tentativa de minimizar estes efeitos, novas metodologias de vacinas têm sido estudadas e novas preparações se mostraram capazes de conferir uma resposta imune protetora, utilizando frações subcelulares ou preparações de membrana para a indução de anticorpos contra lipopolissacarídeos (LPS) de *Leptospira*. Entretanto, essas vacinas apresentam desvantagens como proteção de curta duração, não indução de imunidade cruzada com outros sorovares não incluídos na preparação, sendo necessária a revacinação multivalente, além de possível indução de autoimunidade (Levett, 2001). Em alguns países como Cuba, França, Japão e China há vacinas licenciadas para uso humano baseadas em bactérias inativadas por agentes químicos ou físicos e preparações de membranas, contudo, restrita apenas para indivíduos de alto risco, os quais, por causa de seus empregos podem entrar em contato com água ou animais contaminados (Laurichesse *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2004; Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2004).

Devido à dificuldade de avaliar todas as proteínas codificadas no genoma do patógeno de interesse a vacinologia reversa tem sido bastante empregada para estudos de proteínas secretadas ou expostas conservadas entre as espécies de *Leptospira* que possam ser bons candidatos vacinais, possibilitando uma resposta cruzada (Pinne e Haake, 2009; Zeng *et al.*, 2017; Dellagostin *et al.*, 2017). A combinação de diferentes abordagens é a chave para a construção e otimização de vacinas para leptospirose com melhor e maior tempo de proteção (Dellagostin *et al.*, 2011; Vernel-Pauillac e Werts, 2018).

As proteínas na superfície das bactérias podem induzir resposta imune no hospedeiro durante a infecção, são responsáveis por mediar o processo de adesão inicial às células do hospedeiro, estão relacionadas a disseminação e sobrevivência no hospedeiro e também ao metabolismo celular, principalmente as proteínas transportadoras. Portanto, proteínas de membrana externa bem conservadas são promissores alvos vacinais (Cullen *et al.*, 2002; Haake, 2000). A membrana externa (ME) de bactérias Gram-negativas é uma barreira de permeabilidade muito eficiente contendo proteínas que formam canais para a captação de pequenas moléculas

necessárias para o crescimento celular e função, como carbono e ácidos graxos de cadeia longa (>C15) necessários na beta-oxidação. Praticamente todos os canais de ME são β -barris estáveis a condições adversas frequentemente encontradas do lado de fora das células (Faine *et al*, 1999; Henneberry, 1970).

Estudos comparando os níveis de expressão de proteínas em bactérias atenuadas em cultura e virulentas indicaram que proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídios eram mais expressas nas estirpes virulentas (Zhong *et al.*, 2011). Estas proteínas transportadoras são importantes para o metabolismo e podem influenciar no crescimento bacteriano, com isto, mostram ser potenciais alvos para vacinas. Além do mais, os anticorpos gerados por estas proteínas podem interferir no metabolismo celular, bloqueando os transportadores e facilitando o reconhecimento da bactéria por macrófagos.

Sendo assim, o presente estudo teve como proposta principal a obtenção da proteína codificada pelo gene LIC12524, anotada como transportador de ácidos graxos, avaliação da interferência no metabolismo pela ação dos anticorpos que reconhecem esta proteína transportadora.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O projeto propõe clonar, expressar e purificar a proteína anotada como transportadora de ácidos graxos, codificada pelo gene LIC12524, produzir anticorpos policlonais que reconhecem a proteína e avaliar se os anticorpos são efetivos para interferir no metabolismo celular da bactéria.

2.2 Específicos

- a) Desenho dos oligonucleotídeos para obtenção de produtos de PCR (Reação em cadeia da polimerase) utilizando o programa Generunner®;
- b) Clonagem do gene nos vetores de expressões em *E. coli* pAE;
- c) Sequenciamento dos clones obtidos;
- d) Indução da expressão da proteína recombinante utilizando diferentes estirpes de *E. coli*;

- e) Análise da expressão das proteínas recombinantes quanto sua solubilidade;
- f) Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade a metal;
- g) Imunização de camundongos BALB/c com a proteína LIC12524 para obtenção de anticorpos policlonais contra a proteína recombinante;
- h) Detecção de anticorpo IgG em soro de humanos diagnosticados com leptospirose;
- i) A avaliação dos transcritos da proteína recombinante em *L. interrogans* sorovar Copenhageni atenuada e virulenta;
- j) Avaliação da interação de anticorpos policlonais com *L. interrogans*.

3 METODOLOGIA

3.1 Organismos e vetores

Estirpes da bactéria *Escherichia coli* DH5 α foram utilizadas na clonagem, enquanto estirpes de *E. coli* BL21 DE3, BL21 Star™ (DE3) pLysS, BL21 SI, Rosetta™ (DE3) pLysS, Lemo21 (DE3), C43(DE3), BL21 pGro7 foram empregadas nos ensaios de expressão da proteína recombinante. Estirpes de *L. interrogans* foram cultivadas no Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária, USP, de responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Heinemann. As bactérias são isoladas e cultivadas em meio EMJH líquido (Difco®, Franklin Lakes, NJ, EUA) (Ellinghausen e Mccullough, 1965) com 0,2% de Agar a 28 a 30°C e repique a cada 3 meses.

O vetor pAE (Ramos *et al.*, 2004) é um sistema de alta expressão, controlado pelo promotor do fago T7, havendo expressão de proteína recombinante apenas na presença da T7 RNA polimerase. Ele foi desenvolvido para a expressão de proteínas recombinantes com uma sequência codificadora de 6 resíduos de histidina na região N-terminal facilitando a purificação pelo método de cromatografia de afinidade à metal. O vetor possui o códon ATG de início de transcrição, um sinal de terminação de transcrição, além do gene de resistência ao antibiótico ampicilina.

3.2 Análise de bioinformática

A sequência do gene LIC12524 foi submetido à análise *in silico* para verificação da similaridade entre as sequências de aminoácidos de espécies de *Leptospira* utilizando a ferramenta analítica BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>), que avalia a semelhança entre a sequência de aminoácidos com as sequências disponíveis no GenBank. A predição da localização da proteína foi feita utilizando os programas PSORT (Prediction of Protein Sorting Signals and Localization Sites in Amino Acid Sequences) (Yu *et al.*, 2010) e CELLO (Subcellular Localization Predictor) (Yu; Lin; Hwang, 2004).

Os genes foram analisados para a presença de domínios conservados utilizando o software SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (Letunic *et al.*, 2004). 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/>) e o SignalP (Petersen *et al.*, 2011) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para predição de peptídeo sinal. PsiPred (Jones, 1999) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) e JPred (Cole *et al.*, 2008) (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred>) para predição de estrutura secundária. O modelo da estrutura terciária da LIC12524 foi gerado pelo software online I-TASSER (Zhang, 2008) e visualizado no software PyMOL.

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) (<http://web.expasy.org/protparam/>).

3.3 Extração de DNA genômico

Foi extraído o material genético da bactéria *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 10A (atenuada em cultura). Para tal, foram coletados 3 ml da cultura de leptospiros em microtubo e centrifugados por 10 minutos a 3380 x *g* a temperatura ambiente (T.A). O sedimento formado após a centrifugação foi ressuspensionado em 467 μ l de tampão Tris-EDTA (TE), sendo então adicionados 30 μ l de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 3 μ l de proteinase K (20 mg/ml). A mistura

foi homogeneizada e incubada por 1 hora a 37 °C. Foram adicionados 500 µl de uma solução fenol-clorofórmio (1:1) e agitado até as fases se misturarem completamente. As amostras foram centrifugadas a 8400 x g por 5 minutos, e então o sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo microtubo. Repetiu-se a fase de extração com fenol-clorofórmio (1:1) onde novamente as amostras foram agitadas, centrifugadas a 8400 x g por 5 minutos e o sobrenadante coletado. Foi adicionado 50 µl de acetato de sódio (3M) e 300 µl volume de isopropanol gelado. A solução foi homogeneizada e acondicionada a -20 °C por 1 hora. Após centrifugação de 11300 x g por 20 minutos a 4 °C, o DNA sedimentado foi lavado com 1 ml de etanol 70% e centrifugado novamente a 11300 x g por 20 minutos a 4 °C. O etanol foi desprezado e 50 µL de água estéril foram adicionados para eluição do DNA sedimentado. A concentração do DNA genômico foi determinada por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm.

3.4 Amplificação por PCR do gene

Foram feitas quatro construções de proteínas baseadas no gene LIC12524. Uma contendo seis resíduos de histidina no N-terminal, uma contendo os seis resíduos de histidina no C-terminal e outras duas construções da LIC12524, formadas por partes da proteína no N-terminal (EP1) e no C-terminal (EP2), escolhidas com base nos epítomos ligantes de célula B.

Elas foram obtidas por meio da amplificação por PCR (polymerase chain reaction) a partir do DNA genômico da *L. interrogans* sorovar Copenhageni, previamente extraído e purificado. Para que a amplificação acontecesse foram desenhados quatro pares de oligonucleotídeos (*Senso* e *anti-senso*), conforme mostrado na Tabela 1.

As reações de PCR do gene LIC152524 foram realizadas utilizando PCR buffer 1X; 1 mM dNTP; 5 mM MgCl₂; 0,3 mM de cada oligonucleotídeo (*Senso* e *anti-senso*); 2,5 U Taq polimerase; 100 ng de DNA, para um volume final de 50 µL, já as reações de PCR das construções foram realizadas utilizando PCR buffer 1X; 0,2 mM dNTP; 2 mM MgSO₄; 0,2 mM de cada oligonucleotídeo (*Senso* e *anti-senso*); 1 U Taq High Fidelity polimerase; 100 ng de DNA, para um volume final de 50 µL.

As temperaturas de anelamento utilizadas foram determinadas de acordo com o programa Generunner®, sendo 55 °C para a construção com os resíduos de histidina no N-terminal e 50 °C para as demais construções. Os oligonucleotídeos foram desenhados com bases nitrogenadas adicionais nas extremidades para possibilitar a clonagem direta e com adição dos sítios de restrição *XhoI*, *HindIII* e *NdeI*, respectivos de cada amplificação, às extremidades 5'. 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.

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos para a amplificação do gene LIC12524 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Gene	Oligonucleotídeo sintético	TA	Amplicon
LIC12524 N-term	S: 5' ACGGCTCTCGAGGTGAAAAGAAAATA 3' A: 5' CGGCATAAGCTTTCAATCAAATTTATA 3'	50°C	1458 pb
LIC12524 C-term	S: 5' GCATCATATGGTAAAAGAAAATAACTTTTCA 3' A: 5' CGATAAGCTTTCAGTAGTGGTAGTGGTAGTCAAAATTTATAAGAAGCG 3'	55°C	1458 pb
EP1	S: 5' ACGGCTCTCGAGGCTCGATATGCGGGTATG 3' A: 5' CGGCATAAGCTTTCAGATTGGTCGGGGGTGGAC 3'	55°C	366 pb
EP2	S: 5' ACGGCTCTCGAGGGTGAATGCAAATAGGA 3' A: 5' CGGCATAAGCTTTCACGCCAGTTGTTTCCTGG 3'	55°C	492 pb

Nota: Abreviaturas (em ingles): S, "Senso"; A, "Anti-senso"; TA, temperatura de anelamento utilizada; pb, pares de base.

Os fragmentos obtidos pela reação de amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA). Após a visualização dos fragmentos em transiluminador (FisherBiotech UV Transilluminator FBT1816) em luz UV (312 nm), os mesmos foram purificados utilizando o kit "GFX PCR DNA e gel band purification" (GE Healthcare), e os produtos foram quantificados por absorbância a 260 nm.

3.5 Clonagem no vetor pAE

Os insertos purificados e o vetor pAE foram digeridos com as suas respectivas enzimas de restrição para que apresentassem extremidades coesivas

possibilitando hibridização. O vetor foi estabelecido devido ao seu tamanho reduzido (2,8 kb) e a elevada proporção entre cópias do vetor/célula (200-250 cópias) que facilitam o sequenciamento, e um alto nível de expressão de proteínas recombinantes (Ramos *et al.*, 2004).

Após a digestão enzimática, as amostras dos insertos e do vetor foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 1% e purificadas utilizando-se o kit “GFX PCR DNA Gel Band Purification” (GE Healthcare). A ligação dos insertos ao vetor foi realizada em uma reação utilizando uma proporção molar de 5:1 (inserto/vetor). Incubou-se o inserto e vetor por 10 minutos a uma temperatura de 65 °C, seguido pela adição da enzima T4 DNA ligase (Amersham Pharmacia Biotech, Inc) e incubação por 1 hora a T.A.

Os produtos de ligação foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* DH5 α competentes. As bactérias competentes armazenadas a -80 °C foram descongeladas em gelo (0 °C) e foram adicionados 10 μ l do produto de ligação à 50 μ l de bactérias. As amostras foram incubadas por 30 min em gelo e, em seguida, foram submetidas a um choque térmico por 1 min a 42 °C. Após permanecer novamente em gelo por 5 min, foram adicionados 350 μ l do meio Luria Bertani (LB; 1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl) e incubado por 1 h a 37 °C. O produto foi semeado em placa de meio LB-Ágar contendo ampicilina (100 μ g/ml), sendo incubada por 18 h a 37 °C.

Foram selecionadas colônias aleatórias para verificar a presença do inserto ligado ao vetor. Foi utilizado o método de PCR para avaliar as colônias e a reação utilizada foi a mesma descrita anteriormente, entretanto, utilizando as colônias ao invés de DNA genômico como molde para a amplificação. As colônias com resultado positivo foram inoculadas em 3 ml de meio LB contendo ampicilina (100 μ g/ml) e incubadas por 18 h a 37 °C. Os plasmídeos recombinantes foram extraídos utilizando o kit “*Illustra plasmid Prep Mini Spin*” (GE Healthcare) e, após a reação de digestão utilizando as enzimas de restrição que reconhecem os sítios presentes nas extremidades 5' dos insertos, foi verificada a presença dos insertos novamente por eletroforese em gel de agarose (1%).

3.6 Expressão de proteínas recombinantes

As estirpes utilizadas foram escolhidas, pois possuem o gene da T7 RNA polimerase controlado pelo promotor *lac UV5*, o qual é induzido por IPTG (isopropil-B-D-tiogalactopiranosídeo) (Studier, 1991). Estas e as condições utilizadas para a expressão das proteínas recombinantes estão descritas na tabela 2.

Após a saturação das culturas, elas foram diluídas (1:20) para o volume final de 800 mL de meio LB e seus respectivos antibióticos (100 µg/mL ampicilina e 34 µg/mL cloranfenicol). Nas estirpes pGro7 e Lemo21 foi adicionado L-Arabinose (0,5 mg/ml) e L-Ramnose (2 mM) respectivamente, para a indução de chaperonas e lisozima T7. Então incubadas a 37 °C sob agitação, sendo mensurada a densidade óptica por meio de espectrofotômetro até que a cultura atingisse o valor de 0,6 em leitura a 600 nm (DO_{600nm}), representando o início da fase exponencial de crescimento. Adicionou-se então 0,1 ou 0,01 mM de IPTG para a indução da expressão da recombinante, por 3 ou 16 horas a 18 ou 37 °C, sob agitação, conforme mostrado na tabela 3. Em seguida, as culturas induzidas foram centrifugadas por 10 minutos a 4 °C em 7600 x g, descartando-se o sobrenadante.

Tabela 2 - Estirpes utilizadas para expressão das proteínas recombinantes.

Estirpe	Meio de Cultura	Antibiótico	Suplemento	Indução
DE3	LB	Ampicilina	-	IPTG
C43	LB	Ampicilina	-	
Star pLysS	LB	Ampicilina/Cloranfenicol	-	IPTG
Rosetta pLysS	LB	Ampicilina/Cloranfenicol	-	IPTG
pGro7	LB	Ampicilina/Cloranfenicol	L-Arabinose	IPTG
Lemo21	LB	Ampicilina/Cloranfenicol	L-Ramnose	IPTG

Tabela 3 - Condições utilizadas para cada expressão

Amostra	Estirpe	Temperatura	[] IPTG
N-terminal e C-terminal	DE3	37°C	0,1 mM
	C43	18 °C	0,1 mM
		37°C	
	Star pLysS	37 °C	0,1 mM
pGro7	37°C	0,1 mM	

	Lemo21	18 °C 37°C	0,1 mM
	Rosetta pLysS	37 °C	0,1 mM
EP1	<u>Star pLysS</u>	18 °C <u>37°C</u>	<u>0,1 mM</u> 0,01 mM
	C43	37°C	0,1 mM
EP2	Star pLysS	18 °C	0,1 mM
		37°C	0,01 mM
	<u>C43</u>	<u>37°C</u>	<u>0,1 mM</u>

Nota: As condições marcadas em negrito sublinhadas foram as selecionadas para expressão das proteínas recombinantes.

O sedimento foi ressuspensionado em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8; 200 mM NaCl; 5% glicerol; 0,05% Triton x-100) e sonificado, utilizando um sonicador (Branson, Digital Sonifier) com intensidade de 60% por 30 min com pausas a cada 30 segundos, para o rompimento celular e liberação das proteínas recombinantes. O lisado foi centrifugado novamente e o sobrenadante foi separado, enquanto o sedimento foi solubilizado em tampão desnaturante (50 mM Tris-HCl pH 8; 200 mM NaCl; 8 M uréia). Ambas as frações foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% ou 15% (SDS-PAGE), dependendo do tamanho da proteína expressa.

3.7 Purificação das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas EP1 e EP2 ocorreu por cromatografia de afinidade ao metal. A coluna de cromatografia foi preenchida com a resina Chelating Sepharose (GE Healthcare), carregada com íons Ni²⁺ e equilibrada com o tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,0 e 200 mM NaCl. Após a passagem do sobrenadante, foram feitas sucessivas lavagens com este tampão e concentrações crescentes de imidazol (5 mM, 20 mM, 40 mM e 60 mM) para a remoção de impurezas que possam ter se aderido à coluna. Para a eluição da proteína recombinante, utilizou-se uma solução de imidazol (1 M), coletadas em microtubos de 1,5 ml.

As frações de todas as etapas da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE e western blotting. As alíquotas das etapas de purificação foram separadas por SDS-PAGE e eletro-transferidas para uma membrana de nitrocelulose, seguido pelo bloqueio da membrana com PBS-Tween 0,05% (PBS-T) suplementado com 10% de leite em pó desnatado (PBS-T/leite). Após sucessivas lavagens, adicionou-se solução de anticorpo monoclonal anti-HisTag (1:10000) (Sigma) em PBS-T/leite. Para a detecção, foi utilizado o substrato SuperSignal West Dura (Thermo Scientific) e visualizado em fotodocumentador ImageQuant modelo LAS 400 (GE Healthcare).

As alíquotas que continham proteína recombinante foram dialisadas em tampão PBS 0,1%, efetuando três trocas do tampão, para a total remoção do imidazol.

3.8 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração de RNA, culturas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni virulentas e atenuadas em cultura foram centrifugadas por 15 minutos a 3300 x *g*, ressuspensas em *Trizol* e incubadas em T.A por 10 min. Em seguida, após adicionar 260 µl de clorofórmio e incubar em T.A por 10 min, a amostra foi centrifugada a 12000 x *g* por 15 min a 4 °C. A fase aquosa superior foi separada e foi adicionado 660 µl de isopropanol. Após 10 min em T.A a amostra foi centrifugada a 12000 x *g* por 10 min a 4 °C. A amostra foi ressuspensa em etanol 75%, centrifugada a 7500 x *g* por 5 min a 4 °C e, após secagem no Concentrator plus/Vacufuge® plus (Eppendorf), o RNA purificado foi ressuspensa em água livre de RNase, incubado por 10 minutos a 55 °C e quantificado. O RNA purificado foi incubado com DNase I (Invitrogen) em temperatura ambiente por 1 h. Para o preparo do cDNA, foi utilizado 2 µg do RNA total extraído das estirpes atenuadas e virulentas e o protocolo foi realizado conforme indicações do kit “SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen).

3.9 PCR em tempo real

A avaliação da expressão gênica foi realizada em um termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) utilizando 400 nm dos oligonucleotídeos sintéticos do gene LIC12524 (Tabela 4) com o reagente Power

SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, EUA) diluído uma vez. O ciclo de amplificação utilizado foi 10 minutos a 95 °C e 40 ciclos variando 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 min.

Tabela 4. Sequências de oligonucleotídeos utilizados no qPCR

Gene	Oligonucleotídeos
LIC13086	S: TGAGTTTGGAAATCGGGCTAC A: TCCATTTACCTGGCCACTTC

3.10 Obtenção de anticorpos policlonais das proteínas recombinantes

Cinco camundongos BALB/c fêmeas (18 a 22 g) foram imunizados com 10 µg de cada proteína recombinante juntamente com 12,5% de Alhydrogel [2% Al(OH)₃] usado como adjuvante vacinal. As imunizações foram administradas no dorso, via subcutânea. Foram realizadas 3 imunizações com intervalos de 15 dias. Os animais foram sangrados via plexo retro-orbital após cada imunização. O sangue coletado foi centrifugado por 5 min a 2300 x g, para a separação do soro, o qual foi cuidadosamente coletado e armazenado a -20 °C.

3.11 Titulação de Anticorpos

A presença de anticorpos policlonais específicos nos soros de camundongos imunizados com a proteína recombinante foi avaliada por ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Imobilizou-se 250 ng das proteínas recombinante EP1 e EP2 em tampão carbonato (0,05 M; pH 9,6) em duas placas de ELISA (Sarstedt) de 96 poços, incubando-as por 18 h a 4 °C. Após incubação, as placas foram lavadas com PBS-T e então incubadas com a solução de bloqueio PBS-T/leite por 2 h a 37 °C.

Em uma placa de diluição foi realizada a diluição seriada dos soros de camundongos em solução de bloqueio acrescida de extrato de *E.coli* (10% v/v), e então foram incubados por 1 h a 37 °C para adsorção dos anticorpos inespecíficos, ou seja, anticorpos gerados contra contaminantes de *E.coli* que possam estar presentes nas alíquotas de proteína recombinante purificada. Após a incubação, 50 µl das amostras adsorvidas foram transferidas para a placa de ELISA (Sarstedt) e

incubada por mais 1h a 37 °C. Após esse período, a placa foi lavada com PBS-T e incubada por 1 h com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) em solução de bloqueio (1:5000). Após a incubação a placa foi lavada novamente com PBS-T e a revelação foi feita pela reação da peroxidase com 0,5 mg/ml do substrato OPD (cloridrato de o-fenilenodiamina, *Sigma-Aldrich*) em tampão citrato-fosfato (fosfato de sódio 0,2 M; citrato de sódio 0,1 M; pH 5,0) contendo um 1 µl/ml H₂O₂. A reação foi interrompida após 15 minutos com a adição de 50 µl/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 4N).

A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas (Multiskan- FC, Thermo Fisher Scientific, Helsinki, Finlândia) em comprimento de onda de 492 nm. O título de anticorpos foi determinado a partir da maior diluição dos soros com valor de DO_{492nm} maior ou igual a 0,1.

3.12 Detecção de anticorpo IgG em soro de humanos diagnosticados com leptospirose em fase inicial e fase convalescente da doença

A detecção de anticorpos IgG no soro de pacientes diagnosticados com leptospirose foi realizado por ELISA. A proteína recombinante foi imobilizada em placa de ELISA (Sarstedt) de 96 poços (250 ng de proteína por poço diluída em tampão carbonato (0,1M pH 9,6). As placas foram incubadas por 18 h a 4 °C, lavadas com PBS-T (3 vezes), bloqueadas com PBS-T/leite e incubadas por 2 h a 37 °C. Foram utilizados 20 soros de pacientes diagnosticados com leptospirose nas duas fases da doença (sendo MAT- a fase inicial e MAT+ a fase convalescente) em diluição 1:100 em solução de bloqueio e incubados por 2 h a 37 °C. Os mesmos haviam sido previamente adsorvidos por 1 h em extrato de *E. coli* 10%v/v. As placas foram lavadas com PBS-T, seguindo pela adição do anticorpo secundário, anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), em solução de bloqueio (1:5000) e incubado por 1 h a 37°C. A revelação foi feita conforme descrito anteriormente.

A reatividade de cada soro foi realizada em duplicata e os valores foram expressos como a média dos valores de absorbância. Para a determinação dos soros reativos, foi determinado um valor de corte (*cutoff value*), o qual foi baseado na média da DO de soros comerciais de indivíduos não infectados (Sigma-Aldrich)

somados a três vezes o desvio padrão. Valores acima do *cutoff* foram considerados positivos.

3.13 Avaliação da interação de anticorpos policlonais com *Leptospira*

Para realização do experimento culturas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni virulentas foram contadas em Câmara Petroff-Hausser, centrifugadas a 3380 x g por 10 minutos e o sedimento foi suspenso em tampão PBS (1x). O soro de camundongos imunizados com a proteína recombinante foi inativado pelo calor a 56 °C por 20 minutos e filtrado com membrana de 0,22 µm. Este foi então incubado com a cultura de leptospiros, nas diluições 1:100 e 1:1000, a 30 °C por 2 horas. Após esse período foi feito o repique para as garrafas de cultura com meio EMJH (Difco) com 10 % suplemento Difco (BD), incubadas a 30 °C e medida a DO no comprimento de onda de 420 nm a cada 24 horas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de Bioinformática do gene selecionado

O estudo de proteínas de membrana de *Leptospira* é importante, pois elas são responsáveis pelo contato com o hospedeiro. Diversas destas proteínas atuam nos mecanismos de invasão e evasão do sistema imune do hospedeiro, contribuindo para a disseminação e sobrevivência da bactéria. Essas proteínas também estão relacionadas ao metabolismo celular, como proteínas transportadoras. Pouco se sabe sobre a proteína codificada pelo gene escolhido no presente estudo, portanto softwares ajudaram nas análises iniciais.

Utilizando o software SignalP, pôde-se observar que o gene LIC12524 codifica uma proteína que não possui sítio de clivagem. Adicionalmente, os softwares PSORT e CELLO foram utilizados para definir a possível localização celular da proteína, utilizando-se de algoritmo funcional para bactérias gram-negativas. De acordo com os resultados, a proteína codificada possui alta probabilidade de estar alocada na membrana externa da bactéria.

Ao serem analisadas as sequências de aminoácidos das proteínas pelo software SMART, observou-se que a proteína LIC12524 apresenta uma região

transmembrana entre os aminoácidos 27 e 49, que foi confirmada pelo software TMHMM. Apresenta também um domínio Toluene_X, pertencente à família de proteínas de transporte da membrana externa que inclui várias proteínas envolvidas no catabolismo do tolueno e na degradação de hidrocarbonetos aromáticos. Essa família também inclui a proteína FadL envolvida na translocação de ácidos graxos de cadeia longa através da membrana externa (Wang *et al.* 1995; Berg, 2004).

Os softwares JPred e PsiPred foram responsáveis pela análise da estrutura secundária da molécula, apresentando 13,6% de alfa-hélice e 42,3% de folhas-beta. O software I-TASSER faz a modelagem de estruturas terciárias de proteínas e realiza uma comparação deste modelo gerado com o banco de dados de estruturas depositadas no PDB. A figura foi gerada utilizando o software Pymol, mostrando a forma de um β -barril. Estas usam folhas-beta anfipáticas para atravessar a membrana. A versatilidade das estruturas β -barril é mostrada pela variedade de estruturas que já foram reconhecidas (Buchanan, 1999) (Figura 1).

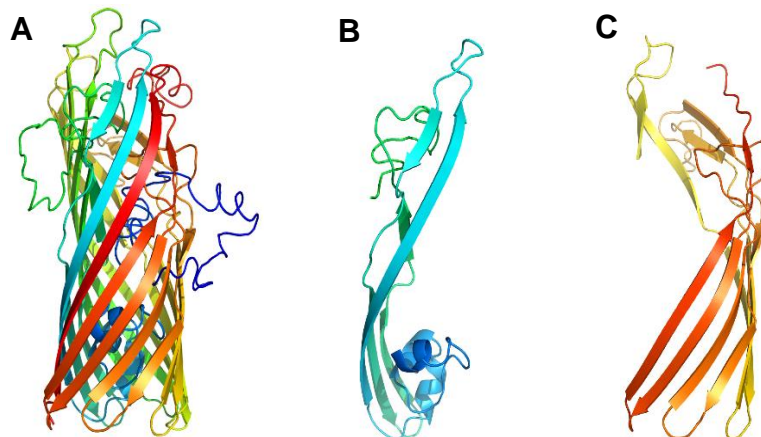


Figura 1. Modelo da estrutura terciária da proteína LIC12524 e outras construções. Figura gerada utilizando o Pymol a partir da modelagem molecular realizada pelo I-TASSER da LIC12524 (A) e de duas construções criadas baseado nos epítomos ligantes de linfócitos B, chamados EP1 e EP2 respectivamente (B e C).

Uma análise de conservação da proteína nas diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* foi realizado através do alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína na ferramenta de BLAST. Esta encontra regiões de similaridade entre sequências biológicas possibilitando visualização das relações funcionais e evolucionárias dentro da família *Leptospiraceae*, as quais foram alinhadas pelo software Clustal Omega, gerando o dendograma ilustrado da Figura 2. Observa-se maior identidade do gene LIC12524 com as espécies patogênicas do que com as

intermediárias e com saprófitas, sendo entre 33 e 56% de identidade com as saprófitas, entre 41 e 59% com as intermediárias e maior que 80% de identidade com as espécies patogênicas.



Figura 2. Dendrogramas de conservação das proteínas entre diferentes espécies de *Leptospira*. Dendrograma da LIC12524, elaborado pelo alinhamento das sequências de aminoácidos, identificados utilizando o software *BlastP*. Em verde estão as espécies saprófitas, em azul as intermediárias e em vermelho as patogênicas.

4.2 Amplificação e Clonagem

A sequência de DNA correspondente ao gene que codifica a proteína LIC12524 e os fragmentos criados foi amplificada por PCR convencional utilizando DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni com o auxílio dos oligonucleotídeos da Tabela 1. A separação em eletroforese de gel de agarose 1% permitiu a visualização dos *amplicons* gerados, que possuíam tamanhos de 1458, 366 e 492 pares de base (pb), correspondentes aos tamanhos esperados para os fragmentos criados a partir do gene LIC12524 (Figura 3).

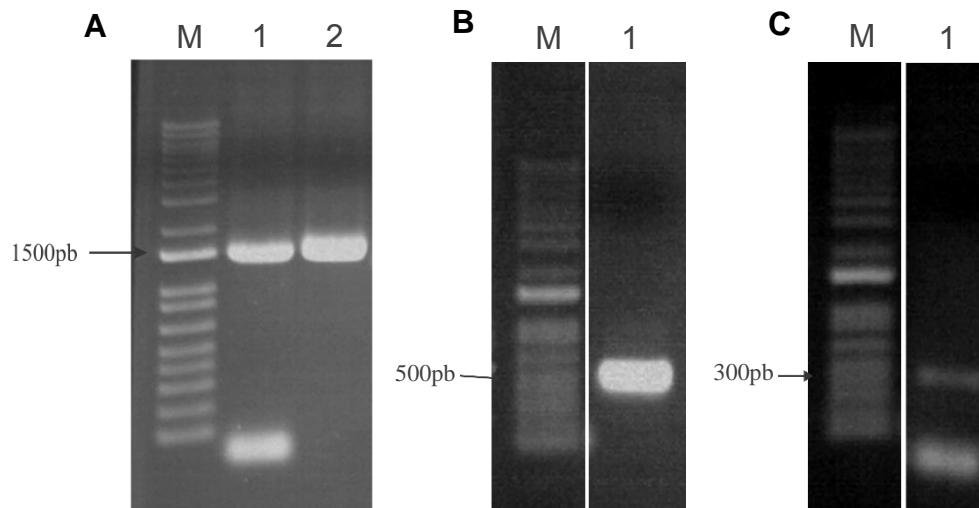


Figura 3. Análise dos amplicons após PCR por eletroforese em gel de agarose 1%. (A) Marcador molecular 1kb DNA ladder (M); amplicon do gene LIC12524 com HisTag na porção N-terminal da proteína (1) e com HisTag na porção C-terminal da proteína (2). **(B e C)** Marcador molecular 1kb DNA ladder (M), construções com C-terminal e N-terminal da proteína LIC12524 desenhada com base nos epitopos ligantes de células B, respectivamente (1).

Os amplicons obtidos foram clonados diretamente no vetor pAE e inseridos em células *E. coli* DH5 α competentes. Após a transformação foi realizado o teste de confirmação de ligação, por meio de uma reação de PCR de colônia (Figura 4) para verificar a presença do inserto no vetor. Os clones que apresentaram insertos amplificados pela reação de PCR foram submetidos à extração plasmidial seguido por um ensaio de restrição, no qual os 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 5).

O vetor pAE, por seu tamanho reduzido, possibilita a clonagem de insertos maiores; apresenta uma sequência que adiciona seis histidinas na porção N-terminal da proteína recombinante, que auxilia na purificação de proteínas, logo após o códon de início ATG. *E. coli* transformadas com o pAE produzem um maior número e cópias de plasmídeos, facilitando a clonagem e sequenciamento dos mesmos (Ramos *et al.*, 2004).

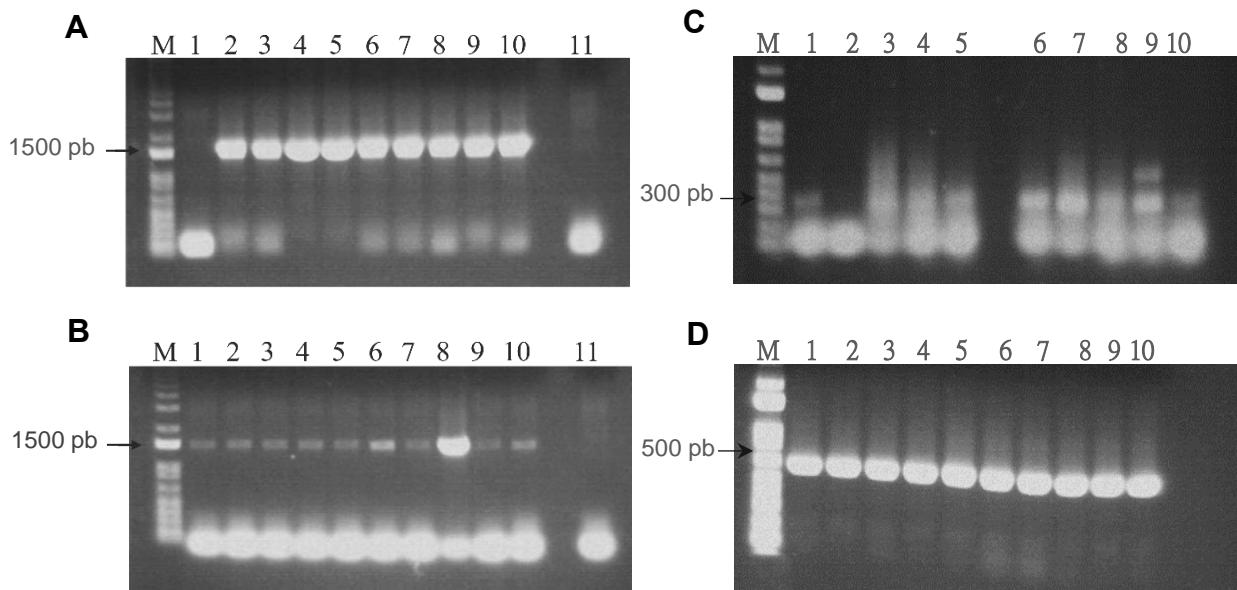


Figura 4. Análise da PCR de colônia após transformação com o plasmídeo pAE recombinante por eletroforese em gel de agarose. (A e B) Clones transformados com HisTag em N-terminal e C-terminal respectivamente. Marcador molecular 1Kb Plus DNA ladder (M); diferentes colônias selecionadas para análise (1-10); controle negativo (11). **(C e D)** Clones transformados com as construções EP1 e EP2 respectivamente. Marcador molecular 1Kb Plus DNA ladder (M); diferentes colônias selecionadas para análise (1-10).

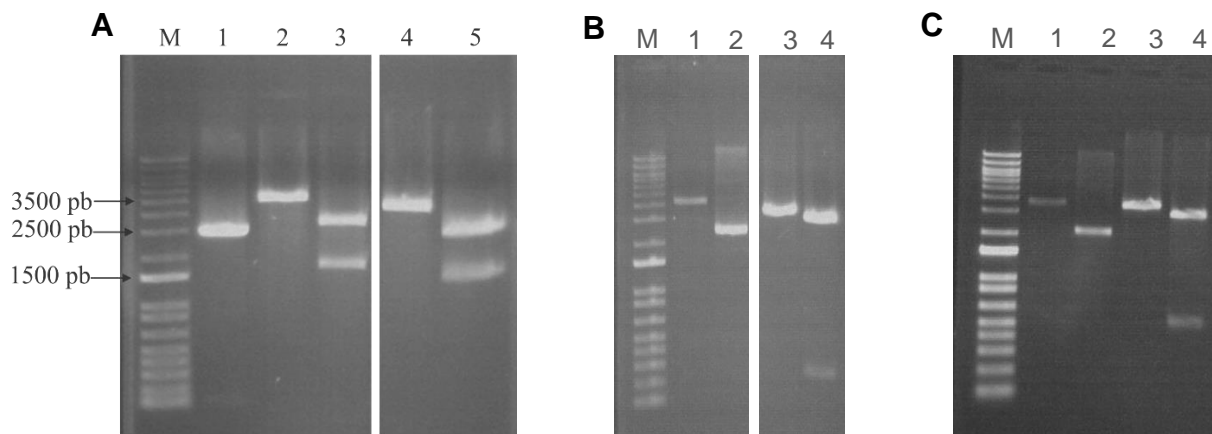


Figura 5. Análise do ensaio de restrição da LIC12524 e suas duas construções. (A) Marcador molecular 1Kb Plus DNA ladder (M), vetor de expressão pAE circular (1), construção da proteína com HisTag na sua poção N-terminal, digerida com as enzimas *XhoI* (2) ou *XhoI* e *HindIII* (3), construção da proteína com HisTag na sua poção C-terminal, digerida com as enzimas *XhoI* (4) ou *XhoI* e *NdeI* (5). **(B e C)** Marcador molecular 1Kb Plus DNA ladder (M), vetor de expressão pAE circular (1), vetor de expressão pAE linear (2), construções da proteína LIC12524 baseadas nos epítomos ligantes de células B, EP1 e EP2, digeridas com as enzimas de restrição *XhoI* (3) ou *XhoI* e *HindIII* (4), respectivamente.

As construções plasmidiais das colônias positivas foram sequenciadas para confirmar se estavam em fase correta de leitura e não apresentavam mutações. Foi possível observar todos os elementos da clonagem (sequência de histidinas, sítios

de restrição enzimática, gene da proteína, identidade com o gene matriz), em fase correta de leitura, confirmando sua viabilidade (dados não mostrados).

4.3 Expressão da proteína recombinante

Foram analisados, por ferramenta de bioinformática, características da proteína recombinante com intuito de otimizar as etapas de expressão e purificação. Na Tabela 5 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, utilizando o programa ProtParam.

Tabela 5 - Massa molecular e PI teórico da proteína e suas construções

Gene	Massa molecular (kDa)	PI teórico
LIC12524	54	9,28
EP1	14	6,35
EP2	20	7,1

Em seguida foi realizado um estudo de indução inicial para estabelecer o tempo de crescimento da bactéria e quantidade de indutor a ser utilizado, como mostrado na tabela 3. Assim, as diferentes estirpes, tornadas previamente competentes por choque térmico, foram transformadas e a expressão das proteínas recombinantes foi induzida por 0,1 mM de IPTG. Após a indução, as culturas foram lisadas e separadas em duas frações, um solúvel (sobrenadante) e outra insolúvel (sedimento). Os resultados foram analisados em gel SDS-PAGE 12% para as proteínas EP1 e EP2 (Figura 6). Embora a banda vista na figura 6B se encontre um pouco acima do esperado, assumiu-se que esta fosse a proteína EP2 expressa. Para confirmar o perfil de expressão gerado pelas diferentes estirpes, as proteínas separadas por SDS-PAGE foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose e visualizadas por Western blotting utilizando anticorpo monoclonal anti-HisTag.

Apesar do perfil de expressão não ter sido visualizado facilmente no gel SDS-PAGE, os resultados obtidos indicam que as construções da proteína com HisTag na porção C-terminal ou N-terminal não foram expressas em nenhuma das estirpes e condições testadas, sendo assim, foram encerrados os estudos as construções da

proteína inteira. A proteína EP1 se mostrou expressa na fração insolúvel da estirpe BL21 Star (DE3) pLysS, enquanto a proteína EP2 se mostrou expressa na fração solúvel da estirpe C43 (DE3), porém os resultados do Western-blotting se mostraram positivos apenas para o EP1, não sendo possível observar a banda do EP2 (Figura 7).

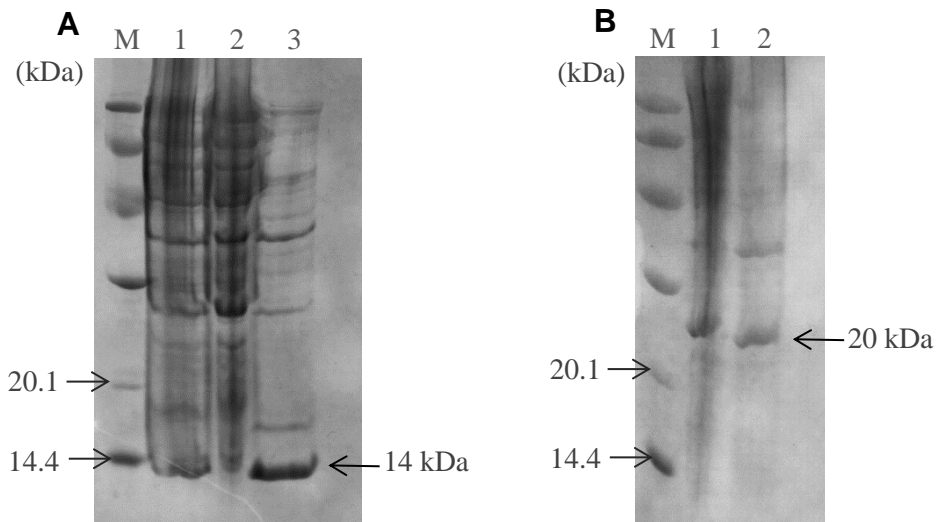


Figura 6. Análise da expressão da proteína recombinante por SDS-PAGE 12%. (A) Teste de expressão da proteína EP1 na estirpe BL21 Star (DE3) pLysS. M: Marcador de peso molecular LMW (kDa) (GE Healthcare), lisado bacteriano total (1), fração solúvel (2), fração insolúvel. **(B)** Teste de expressão da construção EP2 na estirpe C43 (DE3). M: Marcador de peso molecular LMW, fração solúvel (1), fração insolúvel (2).

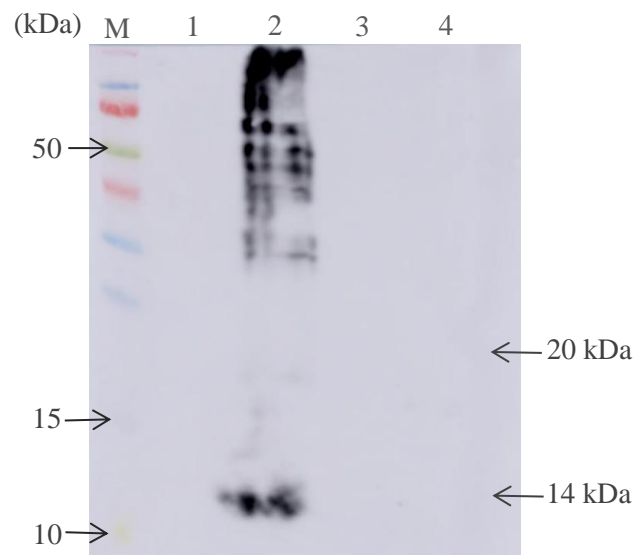


Figura 7. Análise de expressão das proteínas recombinantes EP1 e EP2 detectadas por Western-blotting utilizando anticorpo anti-HisTag. As frações de interesse foram separadas por SDS-PAGE e então eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo monoclonal anti-HisTag conjugado com peroxidase para detecção das proteínas recombinantes. M: Marcador de peso molecular Spectra multicolor (Thermo Scientific), lisado bacteriano total da indução do EP1 na estirpe C43 (DE3) (1) e na estirpe BL21 Star (DE3) pLysS (2), lisado bacteriano total da indução do EP2 na estirpe C43 (DE3) (3) e na estirpe BL21 Star (DE3) pLysS (4). As setas indicam os valores em kDa.

4.4 Purificação e diálise da proteína recombinante

A purificação das construções da proteína recombinante expressas em *E. coli* foi feita por cromatografia de afinidade ao metal, com a resina *Chelating Sepharose* (GE Healthcare) tratada com Ni^{2+} . Como o vetor de expressão pAE adiciona uma sequência de seis resíduos de histidinas na extremidade N-terminal da proteína recombinante, esta se liga a resina impregnada com níquel, via anel imidazólico presente na cadeia lateral da histidina, ao passo que os contaminantes proteicos da cultura são removidos por lavagens contendo concentrações crescentes de imidazol. A proteína recombinante é eluída, por competição, em tampão contendo uma alta concentração de imidazol, sendo posteriormente analisadas por SDS-PAGE. No caso da construção EP1, expressa na fração insolúvel, foi necessária sua solubilização em tampão desnaturante contendo ureia (8 M), a qual foi posteriormente removida pelo método de *refolding* na coluna, passando soluções contendo concentrações decrescentes de ureia, e por fim, seguindo a purificação como citado anteriormente.

As frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE 12% e Western-blotting, no entanto, novamente, não se obteve êxito na visualização das bandas no tamanho esperado utilizando a metodologia empregada. Nota-se que embora a banda vista na figura 8B se encontre um abaixo do tamanho esperado, assumiu-se que esta fosse a proteína EP2 purificada. Diferente do sucesso na purificação dos fragmentos EP1 e EP2, não se obteve êxito na purificação da proteína recombinante inteira (Figura 8). Nesta etapa, a continuidade do estudo com a proteína LIC12524 inteira foi interrompida, uma vez que não foi possível purificá-la pelos métodos disponíveis no laboratório. Após a eluição, as proteínas foram dialisadas em tampão PBS para a remoção do imidazol. A concentração das construções recombinantes foi quantificada por diferentes métodos, como ensaio de Bradford e por espectrofotometria, apresentando uma concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para o EP1 e 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para o EP2.

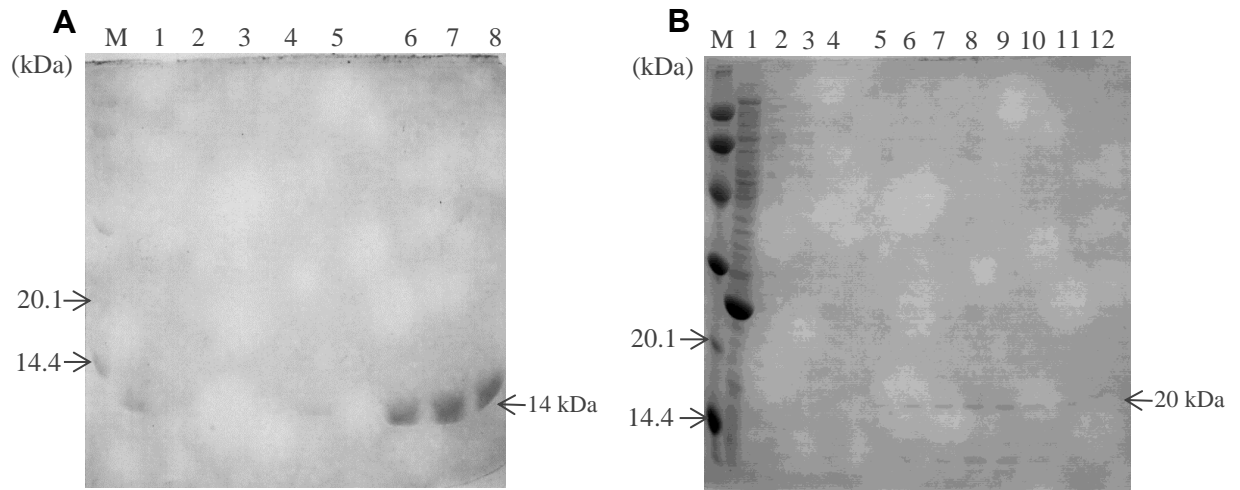


Figura 8. Análise de purificação das proteínas EP1 e EP2. As amostras das etapas de purificação foram separadas por SDS-PAGE (12%) e coradas com Comassie Blue. M: marcador de peso molecular LMW (Ge Helthcare). **(A)** 1: fração insolúvel, 2-5: etapas de lavagem com imidazol 5, 20, 40 e 60 mM, 6-8: proteína eluída com imidazol 1 M. **(B)** 1-4: etapas de lavagem com imidazol 5, 20, 40 e 60 mM, 5-12: proteína eluída com imidazol 1 M. As setas indicam os valores em kDa.

4.5 Avaliação da imunogenicidade da proteína recombinante e titulação de anticorpos

Para avaliar a capacidade da proteína recombinante em estimular o sistema imune de forma específica, camundongos BALB/c foram imunizados pela via subcutânea com três doses de 10 µg de proteína recombinante, adsorvidos em 12,5% de Alhydrogel, utilizado como adjuvante, em intervalos de 15 dias. Duas semanas após cada dose esses animais foram sangrados via plexo retro-orbital e os soros obtidos foram avaliados quanto a presença de IgG. Os dados gerados mostram as duas construções analisadas foram capazes de induzir uma resposta imune humoral, porém se mostraram pouco imunogênicas devido ao baixo título de anticorpos. Enquanto o fragmento EP2 foi capaz de induzir uma maior resposta, com título em média de 51200, o EP1 gerou a média de título de 12800, com exceção do animal 3, que mostrou um valor elevado de título para as duas construções de 25600 para EP1 e 102400 para EP2 (Figura 9).

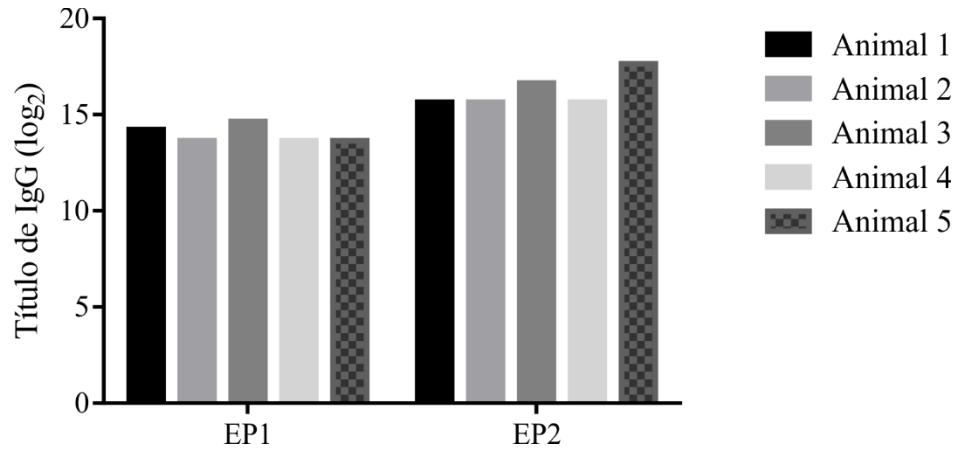


Figura 9. Avaliação da imunogenicidade das construções EP1 e EP2 em camundongos. Após a imobilização em placas (250 ng), as proteínas recombinantes foram incubadas com antissoro em diluições crescentes. A detecção foi realizada utilizando anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000). O título foi considerado o valor de diluição que foi observado a absorvância aproximada de 0,1. Os dados estão expressos em logaritmo na base 2.

Os anticorpos obtidos pelas imunizações foram capazes de reconhecer as proteínas recombinantes através de Western-blotting, indicando especificidade. As proteínas foram aplicadas em SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após a incubação com o antissoro e detecção por quimioluminescência foram observadas bandas nas alturas esperadas de 14 kDa para o EP1 e 20 kDa para o EP2, confirmando os resultados de expressão e purificação da proteína EP2 antes mostrados (Figura 10).

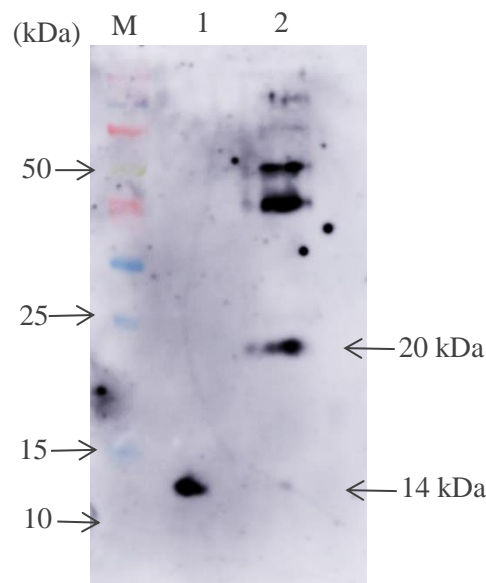


Figura 10. Análise por Western blotting das proteínas recombinantes utilizando o anticorpo obtidos com a imunização de camundongos. As construções purificadas das proteínas foram separadas por SDS-PAGE 12% e eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose. A membrana foi incubada com antissoro (1:3000) e a detecção foi realizada utilizando anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000). M: Marcador de peso molecular Spectra multicolor, EP1 (1) e EP2 (2). As setas indicam os valores em kDa.

4.6 Reatividade com o soro de pacientes diagnosticados com leptospirose

O ensaio foi realizado com o intuito de avaliar se a proteína é reconhecida e gera anticorpos pelo hospedeiro no momento da infecção, e se haveria maior reatividade com soro de pacientes na fase inicial (MAT -) ou na fase convalescente (MAT +). Foi testado um total de 20 amostras pareadas de pacientes em ambas as fases da doença. As amostras foram consideradas reativas quando apresentaram valores maiores do que o estabelecido pelo *cutoff*, calculado a partir da reatividade da proteína com um *pool* de soros de indivíduos saudáveis comerciais (Sigma-Aldrich). O valor de *cutoff* obtido foi de 0,06 para o EP1, 0,16 para o EP2 e de 0,06 para a associação dos EP1 e EP2.

Como observado na figura 11, a maioria dos valores de absorbância obtidos estão abaixo do *cutoff*. A reatividade para a proteína EP1 foi de 10% na fase MAT- e 30% na fase MAT+, para a proteína EP2 foi de 20% na fase MAT- e 15% na fase MAT+ e para a junção das duas proteínas EP1+EP2 obteve-se uma reatividade de 10% na fase MAT- e 20% na fase MAT+. Estes resultados sugerem que a proteína é capaz de ser reconhecida pelo sistema imune e assim gerar anticorpos durante o processo de infecção, porém com uma baixa imunogenicidade, corroborando com a baixa atividade imunigênica observada no experimento de imunização em modelo animal.

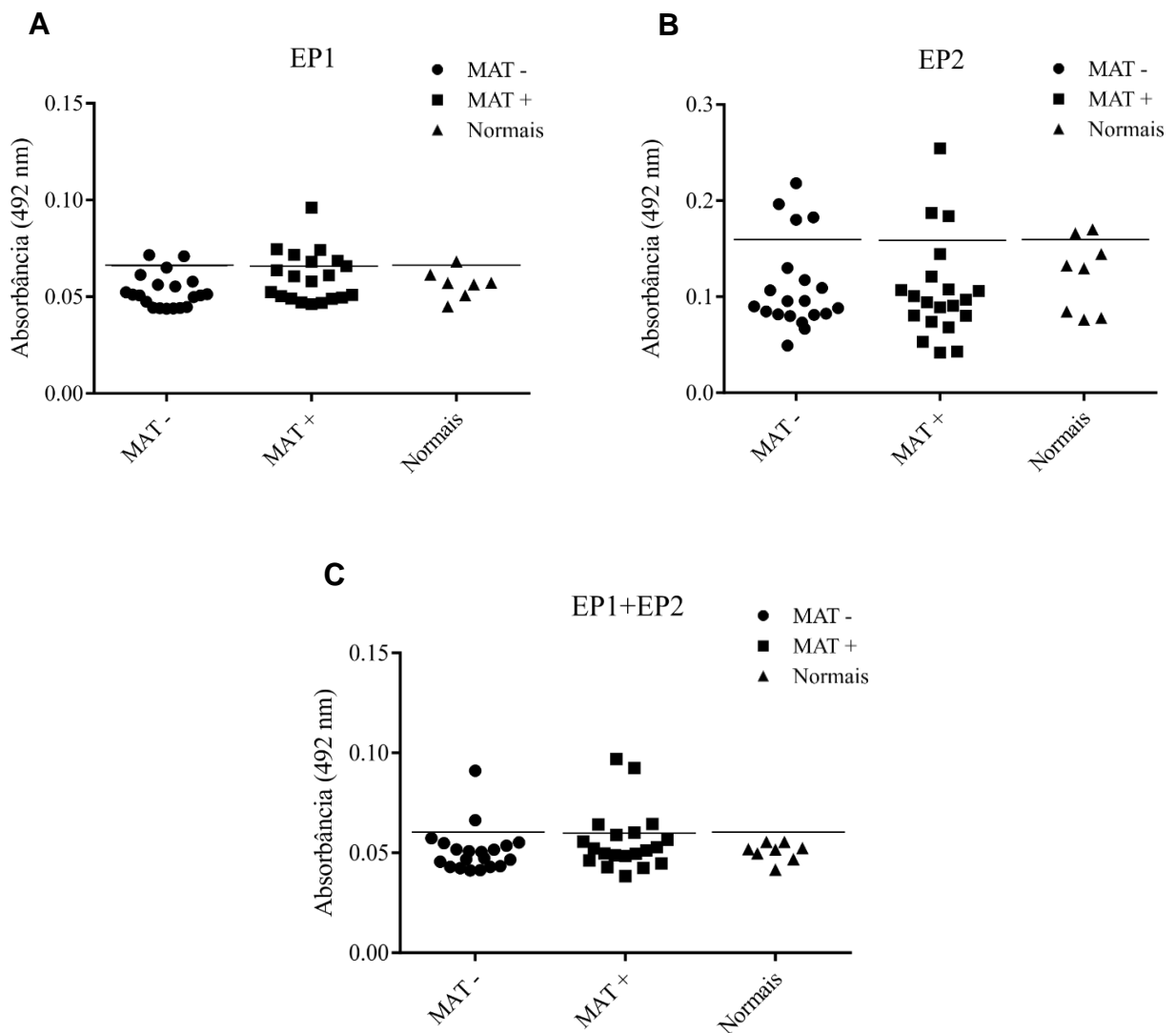


Figura 11. Reatividade das proteínas recombinantes como soro de pacientes diagnosticados com leptospirose por ELISA. As construções EP1 (A), EP2 (B) e um mix (C) contendo ambos foram imobilizadas em placa de ELISA (1 µg/poço) e inoculadas com soros pareados de pacientes diagnosticados com leptospirose, na fase convalescente (MAT+) e na fase inicial (MAT-), na diluição de 1:100. A detecção da reatividade foi feita por incubação com anti-IgG humano conjugado com peroxidase (1:3000). Os respondedores são considerados aqueles acima do valor do *cutoff* (traço horizontal), definida como a média dos pacientes saudáveis somada três vezes o desvio padrão.

4.7 Avaliação dos transcritos em *L. interrogans* sorovar Copenhageni em estirpes atenuadas e cultura e virulentas

Após diversas passagens em seu meio de cultura a *L. interrogans* perde sua capacidade de infecção, devido ao silenciamento de alguns genes de virulência. Foi avaliada a presença de transcritos da proteína tanto na estirpe virulenta quanto na atenuada em cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Os resultados obtidos por qPCR utilizando o gene 16S como normalizador, mostram que a LIC12524

apresentou uma quantidade aproximadamente 45 vezes maior de transcritos na estirpe virulenta quando em comparação com a atenuada. Com isto, é possível que a proteína em questão tenha sua função metabólica alterada nas diferentes estirpes, tendo sido possivelmente silenciada na atenuação da bactéria em cultura.

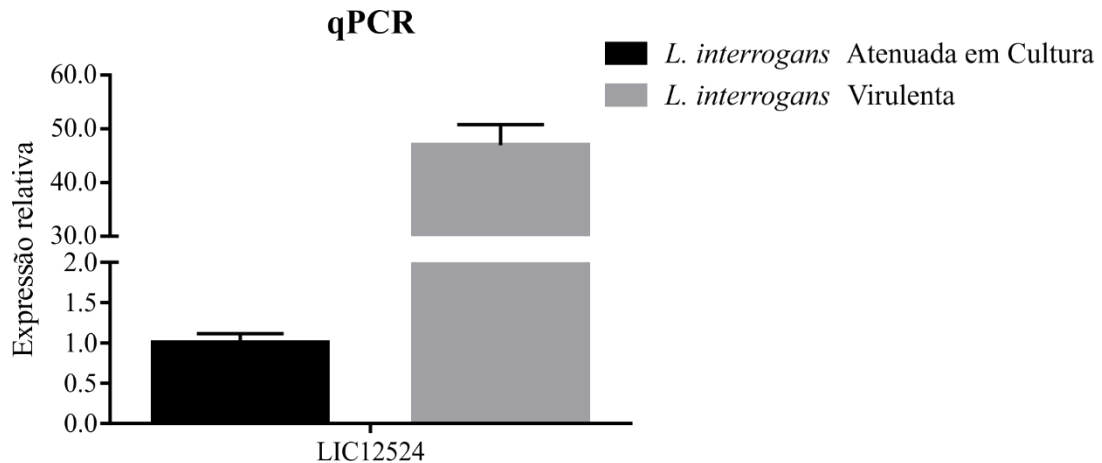


Figura 11. Análise dos transcritos em *L. interrogans* sorovar Copenhageni atenuada e virulenta. A expressão foi avaliada por qPCR e os resultados apresentados em expressão relativa. As barras representam a média de triplicatas, representativas de três experimentos independentes.

4.8 Avaliação da interação de anticorpos policlonais com *L. interrogans*

A *Leptospira* é incapaz de sintetizar ácidos graxos de cadeia longa, assim deve obtê-los a partir do meio em que se encontra. Estes são utilizados como fonte de carbono e são metabolizados por meio da β -oxidação. A proteína LIC12524 é uma proteína de membrana externa com uma região transmembrana, descrita como um transportador de ácido graxo, sendo assim uma proteína importante para o metabolismo energético da bactéria. Assim, foi desenvolvido um experimento com o intuito de avaliar se a interação entre *L. interrogans* e os anticorpos policlonais gerados interferiria de alguma forma no crescimento e proliferação da bactéria.

Então, os anticorpos e a bactéria foram incubados numa proporção 1:100 e 1:1000 e avaliados a cada 24 horas, por meio da contagem de células e medição da DO no comprimento de 420 nm. O experimento foi realizado duas vezes, porém, em ambas, nas primeiras 24 horas foi detectada contaminação nas culturas, provavelmente proveniente do soro utilizado, apesar de todas as precauções tomadas para evitar qualquer forma de contaminação.

5 CONCLUSÕES

A proteína LIC12524 pode estar localizada na membrana externa da *L. interrogans* e apresenta uma região transmembrana, sendo possivelmente uma proteína transportadora. Ela é altamente conservada nas espécies patogênicas e apresenta uma maior expressão na estirpe virulenta em comparação à atenuada em cultura, indicando que pode haver diferença entre os metabolismos caso a proteína atue como transportador de ácidos graxos. Sua expressão foi possível apenas quando fragmentada em duas frações. Embora as proteínas tenham sido detectadas em soros de pacientes diagnosticados com leptospirose e se mostrado capazes de induzir uma resposta humoral em modelo animal, a detecção foi muito baixa e com baixos títulos gerados. Mais estudos são necessários para avaliar o efeito dos anticorpos no metabolismo de *L. interrogans*.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol**, v. 140, n. 3-4, p. 287-96, Jan 2010.
- BERG, B. VAN. DEN. Crystal Structure of the Long-Chain Fatty Acid Transporter FadL. **Science**, v. 304, n. 5676, p.1506-1509, jun. 2004.
- BHARTI, Ajay R et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p.757-771, dez. 2003.
- BOURHY, P. et al. Leptospira mayottensis sp. nov., a pathogenic species of the genus Leptospira isolated from humans. **International journal of systematic and evolutionary microbiology** vol. 64, 2014.
- BRENNER, D. J. et al. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for Leptospira alexanderi sp. nov. and four new Leptospira genomospecies. **Int J Syst Bacteriol**, v. 49 Pt 2, p. 839-58, Apr 1999.
- BUCHANAN, S. β -Barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. **Current Opinion In Structural Biology**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.455-461, ago. 1999.
- COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 9, p. e0003898, Sep 2015.
- CULLEN, P. A. et al. Global analysis of outer membrane proteins from Leptospira interrogans serovar Lai. **Infect Immun**, v. 70, n. 5, p. 2311-8, May 2002.
- DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Hum Vaccin**, v. 7, n. 11, p. 1215-24, Nov 2011.
- DELLAGOSTIN, O. A. et al. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 1, Jan 2017.

ELIS W. A. Animal Leptospirosis. In: Adler B, editor. *Leptospira and Leptospirosis*: Springer; p. 99–137, 2014.

FAINE, S. et al. *Leptospira and Leptospirosis*. **MediSci**, 2 Ed., p. 272, 1999.

FORBES, A. E. et al. Leptospirosis and Weil's disease in the UK. **QJM**, v. 105, n. 12, p.1151-62, Dec 2012.

FOUTS, D. E. et al. What makes a bacterial species pathogenic?: Comparative genomic analysis of the genus *Lepstospira*. **Plos Negl Trop Dis**, v. 10, n. 2, p. e0004403, 2016.

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

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v. 146 (Pt 7), p. 1491-504, Jul 2000.

HENNEBERRY, R. C.; COX, C. D. β -Oxidation of fatty acids by *Leptospira*. **Canadian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.41-45, 1 jan. 1970.

JOHNSON, R. C.; FAINE, S. *Leptospira*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 62-67, 1984.

JONES, DAVID T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices 1 Edited by G. Von Heijne. **Journal Of Molecular Biology**, v. 292, n. 2, p.195-202, set. 1999.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 10, p. 736-47, Oct 2009.

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

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

LEPORE, B. W. et al. Ligand-gated diffusion across the bacterial outer membrane. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 108, n. 25, p.10121-10126, May 2011.

LETUNIC, I. et al. SMART 4.0: towards genomic data integration. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. Database issue, p. D142-4, Jan 2004.

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

LI, C. et al. Spirochete periplasmic flagella and motility. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v. 2, n. 4, p. 345-54, 2000.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nat. Methods**, v. 8, p. 785–786, 2011.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* ssp. In humans. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 10, p. 1265-1276. Aug 2000.

MARTÍNEZ, R. et al. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. **Rev Panam Salud Publica**, v. 15, n. 4, p. 249-55, Apr 2004.

MCBRIDE, A. J. et al. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 18, n. 5, p. 376-86, Oct 2005.

PINNE M., HAAKE D. A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. **PloS one**, vol. 4,6 e6071. Jun. 2009.

RAMOS, C. R. et al. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 8, p. 1103-9, Aug 2004.

RODRIGUEZ-GONZALEZ, I. et al. Efficacy of Spirolept vaccine against human leptospirosis as estimated by passive protection of laboratory rodents. **Med Mal Infect**, v. 34, n. 5, p. 196-200, May 2004.

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

VINCENT, A. T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 5, p. e0007270, May 2019.

VINETZ, J. M. et al. Sporadic urban leptospirosis. **Ann Intern Med**, v. 125, n. 10, p. 794-8, Nov 1996.

VERNEL-PAUILLAC, F.; WERTS, C. Recent findings related to immune responses against leptospirosis and novel strategies to prevent infection. **Microbes And Infection**, v. 20, n. 9-10, p.578-588, out. 2018.

WANG, Ying et al. Identification of a membrane protein and a truncated LysR-type regulator associated with the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* F1. **Molecular And General Genetics Mgg**, v. 246, n. 5, p.570-579, set. 1995.

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.; LIN, C. J.; HWANG, J. K. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. **Protein Sci**, v. 13, n. 5, p. 1402-6, May 2004.

YU, N. Y. et al. PSORTdb--an expanded, auto-updated, user-friendly protein subcellular localization database for Bacteria and Archaea. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. Database issue, p. D241-4, Jan 2011.

ZENG, L. B. et al. "A Novel Pan-Genome Reverse Vaccinology Approach Employing a Negative-Selection Strategy for Screening Surface-Exposed Antigens against leptospirosis". **Frontiers in microbiology**. vol. 8, p. 396. Mar. 2017.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 40, Jan 2008.

ZHONG, Yi et al. Comparative proteogenomic analysis of the *Leptospira interrogans* virulence-attenuated strain IPAV against the pathogenic strain 56601. **Cell Research**, v. 21, n. 8, p.1210-1229, mar. 2011