

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

Clonagem e expressão da proteína LipI 31 de *Leptospira interrogans*

Leticia Andre Rodrigues

São Paulo
2019

Leticia Andre Rodrigues

Clonagem e expressão da proteína LipL31 de *Leptospira interrogans*

Monografia de Conclusão do Curso de Especialização Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos do Instituto Butantan, sob orientação de Ana Lucia T. O. do Nascimento.

São Paulo

2019

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Rodrigues, Leticia Andre

Clonagem e expressão da proteína LipL 31 de *Leptospira interrogans* / Leticia Andre Rodrigues; orientador Ana Lucia T. O. Do Nascimento ; coorientador Leandro Kochi. – São Paulo, 2019.

28 p.: 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 Especialização em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos.

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno a partir de modelo desenvolvido pela
Biblioteca do Instituto Butantan

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

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Leticia Andre Rodrigues, aluno(a) do curso de especialização em Biotecnologia 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
 Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 22 de Fevereiro de 2019

Leticia Andre Rodrigues
aluno(a)

De acordo: Pre Nazareno
Orientador(a):

RESUMO

Leptospira é um gênero de bactérias Gram-negativas pertencentes à ordem Spirochaetales e família Leptospiraceae. Espécies patogênicas são responsáveis pela infecção humana e veterinária chamada leptospirose, que afeta principalmente países tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil. O conhecimento dos mecanismos de patogenicidade das leptospirosas é limitado e a vacina é sorovar dependente. A vacinologia reversa então foi aplicada no estudo das proteínas da membrana externa (OMPs) que têm o potencial de interagir com os componentes do hospedeiro. A este respeito, os ensaios de localização celular são ensaios importantes para o rastreamento de OMPs e a LipL31, uma proteína localizada na membrana citoplasmática das leptospirosas, pode ser utilizada como controle experimental na validação desses ensaios. A partir do genoma sequenciado de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, o gene LIC11456 foi analisado *in silico*, e amplificado sem peptídeo sinal para clonagem no vetor pAE utilizando *E. coli* DH5 α . A LipL31 recombinante foi expressa na cepa de *E. coli* DE3 Star pLysS com adição de 1 mM de IPTG em meio LB e depois purificado a partir da fração solúvel por cromatografia de afinidade com metal (Ni²⁺). A estrutura secundária do LipL31 recombinante foi analisada por difração de raios X como forma de avaliar o enrolamento estrutural, a recombinante apresentou 70% de sua estrutura composta por α -hélice, que é semelhante aos dados *in silico* previstos. A proteína reproduziu experimentos de localização já realizados indicando ser interna, e sugere-se que sua conformação oligomérica mais estável seja na forma de dímero.

Palavras-chave: *Leptospira*, leptospirose

ABSTRACT

Leptospira is a genus of Gram-negative bacteria belonging to the order *Spirochaetales* and family *Leptospiraceae*. Pathogenic species are responsible for human and veterinary infection called leptospirosis, which affect mainly tropical and subtropical countries, including Brazil. Knowledge of the pathogenicity mechanisms of leptospires is limited and the vaccine is serovar-dependent. The reverse vaccinology has been applied in the study of outer membrane proteins (OMPs) that have the potential to interact with the host components. In this regard, cell localization assays are important assays for screening of OMPs. LipL31, a protein located in the cytoplasmic membrane of leptospires, may be used as an experimental control in validation of these assays. From the sequenced genome of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni, the LIC11456 gene was analyzed *in silico*, and amplified without peptide signal for cloning into the pAE vector using *E. coli* DH5 α . Recombinant LipL31 was expressed in the strain *E. coli* DE3 Star pLysS with addition of 1 mM IPTG in LB medium and then purified from the soluble fraction by metal affinity chromatography (Ni²⁺). The secondary structure of the recombinant LipL31 was analyzed by circular dichroism as a way of evaluating the structural winding, the recombinant presented 70% of its structure composed by α -helix, which is similar to the predicted *in silico* data. The protein reproduced localization experiments already performed indicating to be internal, and it is suggested that its more stable oligomeric conformation is in the form of dimer.

Palavras-chave: *Leptospira*, leptospirosis

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
1.1 LEPTOSPIRA.....	8
1.2 LEPTOSPIROSE.....	8
OBJETIVOS	11
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
METODOLOGIA.....	11
4.1 ORGANISMOS E SOROS UTILIZADOS	11
4.2 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	12
4.3 AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO GENE	12
4.4 CLONAGEM	13
4.5 SEQUENCIAMENTO DO CLONE	14
4.6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPL31 RECOMBINANTE	15
4.7 ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR	16
4.8 AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	16
4.9 AVALIAÇÃO DO ESTADO OLIGOMÉRICO DA PROTEÍNA.....	17
4.10 ENSAIO DE LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA DA LIPL31	18
5.2 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM	19
5.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	21
5.4 PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	22
5.5 AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM CAMUNDONGOS	25
5.6 AVALIAÇÃO DO ESTADO OLIGOMÉRICO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	25
5.7 ENSAIO DE CONSERVAÇÃO ANTIGÊNICA DA PROTEÍNA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>LEPTOSPIRA</i>	26
5.8 ENSAIO DE LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA LIPL31.....	27
CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS	28

INTRODUÇÃO

1.1 LEPTOSPIRA

As leptospiras são bactérias espiroquetas bastante móveis, com um tamanho entre 0,10 a 0,15 µm de diâmetro por 6 a 12 µm de comprimento e possuem a célula terminada em gancho e dois flagelos periplasmáticos axiais, os quais as diferenciam de outras espiroquetas (Levett, 2001), além de apresentarem lipopolissacarídeos na membrana externa, classificando-as como gram-negativas (Faine et al., 1999; Haake, 2000; Picardeau, 2017; Li et al., 2000). A sua membrana plasmática também está associada com uma camada espessa de peptidoglicanos, característica de bactérias gram-positivas, dificultando sua visualização através do método de coloração de Gram, por isso o método padrão utilizado é a microscopia de campo escuro ou microscopia eletrônica (Faine et al., 1999; Adler e De La Peña Moctezuma, 2010).

O gênero *Leptospira* pertence à família *Leptospiraceae* e é classificado de forma genética, pela hibridização do DNA, e de forma sorológica, baseada na resposta imunológica heterogênea para os diversos LPSs presentes. Na classificação filogenética existem 22 espécies das quais 10 são espécies patogênicas são elas: *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. alexanderi*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. kmetyi*, *L. alstoni* e *L. mayottensis*; 5 espécies patogênicas intermediárias (causadoras da doença com sintomas brandos): *L. inadai*, *L. fainei*, *L. broomii*, *L. licerasiae* e *L. wolffii*; e 7 espécies saprofíticas, de vida livre e não infecciosas: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. idonii*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae* e *L. yanagawae* (Brenner et al., 1999; Bharti et al., 2003; Ko et al., 2009; Smythe et al., 2013; Bourhy et al., 2014). Outra classificação de *Leptospira* é a identificação sorológica de acordo com o teste de microaglutinação (MAT), baseado na variedade antigênica do LPS (sorovares) e nos antígenos em comum (sorogrupos), contabilizando 250 sorovares agrupados em 24 sorogrupos. (Plank D., 2000; Adler e De la pena Moctezuma, 2010). Esta classificação é complementar a classificação genética, auxiliando em estudos epidemiológicos e de distribuição geográfica das espécies (Ko et al., 2009).

1.2 LEPTOSPIROSE

Leptospirose é uma infecção humana e veterinária de preocupação mundial causada por *Leptospiras* patogênicas, é endêmica em regiões tropicais e subtropicais, tornando-se

epidêmica em períodos chuvosos, principalmente em áreas metropolitanas onde a falta de saneamento e lixo nas ruas podem ocasionar enchentes e a proliferação do principal agente transmissor/carreador da doença, os ratos, em particular *Rattus norvegicus* (Ministério da Saúde, 2018). A infecção ocorre por contato direto com urina de animais infectados ou indiretamente por meio de água e solo contaminados (Bharti et al., 2003; Ko et al., 2009; Faine et al., 1999). A bactéria penetra no organismo através de cortes ou abrasões na pele, ou pelas membranas mucosas, e após a entrada a bactéria se instala e multiplica-se nos túbulos renais proximais.

Os humanos são considerados os hospedeiros acidentais e terminais das leptospirosas, e os sintomas da infecção variam de acordo com o sorovar, idade do hospedeiro e sua situação de saúde. A infecção pode ser assintomática, branda (com presença de febre, cefaleia e mialgia) sendo de difícil diagnóstico, ou grave, desencadeando a Síndrome Hemorrágica Pulmonar Associado à Leptospirose ou Síndrome de Weil, em que a taxa de mortalidade varia de 4 a 50% dos pacientes acometidos ou (Takafuji et al., 1984; Levett, 2001; Adler e De La Peña Moctezuma, 2010; Forbes et al., 2012).

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 2007 a 2017, sendo as regiões Sul e Sudeste mais afetadas. Acredita-se ainda que os dados são subestimados dadas as dificuldades do diagnóstico já que os sintomas brandos podem ser facilmente confundidos com outras doenças como dengue, gripe e malária. O método diagnóstico indicado pela OMS, teste de aglutinação microscópica (MAT), não permite uma identificação precoce da doença e ainda pode ser ineficiente na identificação da colonização renal por *Leptospira* (Werts e Vernel-Pauillac, 2018).



Figura 1. Casos confirmados e de óbito relacionados a leptospirose no Brasil.
Dados atualizados no dia 15 de Janeiro de 2019 (Sinan/SVS/MS)

Por ser a leptospira um organismo diferenciado em suas características bacterianas, os mecanismos da imunidade inata e adquirida envolvidos na infecção desse patógeno ainda não foram bem esclarecidos. Sabe-se, porém, que para uma proteção completa é necessário também a ativação da imunidade celular (Rodriguez-Gonzalez et al., 2004; Ko et al., 2009; Naiman et al., 2002).

Vacinas preparadas com bacterinas (emulsão de bactérias mortas ou inativadas) são as únicas licenciadas até então e capazes de ativar o sistema imune humoral, porém ainda limitadas pela falta de resposta cruzada e sendo necessária a revacinação de vacinas multivalentes. Esse tipo de vacina tem sido principalmente usado na China, Cuba, França e Japão, com preparação dos sorovares prevalentes na região para humanos e em outros países como vacina veterinária (Martinez et al., 2004; Koizumi, Watanabe, 2005; Yanaginnaha et al., 2007). Novas metodologias de vacinas têm sido estudadas, como a vacina de subunidades e vacinas recombinantes utilizando proteínas ou bactérias atenuadas com LPS mutado com intuito de melhorar a proteção (Adler, 2015; Vernel-Pauillac e Werts, 2018).

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 e possibilitando a resposta cruzada (Haake e Pinne, 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 localizadas na membrana extracelular em leptospiros patogênicas são importantes candidatos vacinais e são submetidas a diferentes ensaios que permitem inferir a localização com maior precisão, como fracionamento da membrana utilizando Triton x-114 (Haake *et al.*, 1999), proteólise da superfície celular por proteinase K (Pinne e Haake, 2009) e imunofluorescência (Pinne e Haake, 2011). Entretanto, todos estes ensaios necessitam de controles experimentais, ou seja, proteínas descritas e caracterizadas como expostas ou não expostas na superfície do patógeno, para a validação destes diferentes ensaios de localização celular.

Com base nessa necessidade, o presente projeto tem como proposta a obtenção da proteína LipL31 de *L. interrogans*, caracterizada como proteína de membrana citoplasmática

(Haake e Matsunaga, 2002), e a avaliação para sua utilização como um controle experimental em ensaios de localização celular.

OBJETIVOS

O projeto propõe clonar, expressar e purificar a proteína de membrana citoplasmática LipL31, verificando sua reatividade com diferentes espécies de *Leptospira*, afim de usá-la como controle negativo em ensaios de localização celular.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenho dos oligonucleotídeos para obtenção de produtos de PCR (Reação em cadeia da polimerase) utilizando o programa Generunner®;
- b) Subclonagem dos produtos de PCR utilizando o vetor pGEM-T Easy (Promega);
- c) Clonagem do gene nos vetores de expressões em *E. coli* pAE (Ramos et al., 2004);
- d) Sequenciamento dos clones obtidos;
- e) Indução da expressão da proteína recombinante utilizando diferentes cepas de *E. coli*;
- f) Análise da expressão das proteínas recombinantes quanto sua solubilidade;
- g) Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade a metal;
- h) Imunização de camundongos BALB/c com a proteína LipL31 para obtenção de anticorpos policlonais contra a proteína recombinante;
- i) Western blotting da proteína com soro policlonal obtido em camundongo.

METODOLOGIA

4.1 ORGANISMOS E SOROS UTILIZADOS

No presente estudo foi utilizada cepa patogênica virulenta *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, as cepas patogênicas atenuadas em cultura *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, e a cepa não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1. As bactérias foram cultivadas a 28°C sob condições aeróbicas em meio EMJH líquido (Difco®, Franklin Lakes, NJ, EUA) (Ellinghausen e Mccullough, 1965) modificado 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%). A bactéria *Escherichia coli* DH5 α foi utilizada na clonagem e *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS usada nos ensaios de expressão.

4.2 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

A sequência completa do gene *lipL31* de *L. interrogans* sorovar Conpenhageni, está disponível no banco de genoma GenBank. A análise *in silico* da localização da proteína foi feita pelos programas PSORT e CELLO.

A ferramenta Clustal Omega, ferramenta de alinhamento múltiplo das sequências diferentes obtidas do GenBank, disponibilizando relações evolucionárias através de filograma. O programa BLAST foi usado para analisar similaridades destas sequências com as de outras espécies e sorovares de *Leptospira* presentes no banco de dados. Cálculos de massa molecular e ponto isoelétrico (pI) das proteínas recombinantes foram realizados através da sequência de aminoácidos no software ProtParam.

4.3 AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO GENE

A sequência do gene *lipL31* (LIC11456) foi obtida por meio da amplificação por PCR (polymerase chain reaction) a partir do DNA genômico da *L. interrogans* sorovar Copenhageni, previamente extraído e purificado. A reação de PCR foi realizada utilizando-se PCR buffer; 0,2 mM dNTP; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM de cada oligonucleotídeo (forward e reverse); 2,5 U Taq polimerase; 100 ng de DNA, para um volume final de 50 μ L. As temperaturas de anelamento utilizadas foram determinadas de acordo com o programa Generunner®. Os oligonucleotídeos foram desenhados com bases nitrogenadas adicionais nas extremidades para possibilitar a clonagem direta, de forma a amplificar o gene sem a sequência do peptídeo sinal e com adição dos sítios de restrição BamHI e KpnI às extremidades 5', conforme mostrado na Tabela 1.

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

Gene	Sequência 5'-3'	TA	Amplicon
LipL31	F – 5' ATCGGGATCCTGTGGAGATAATTCCGAAG – 3' R – 5'ATCGGGTACCTTACTGCCAGTAGTTTT – 3'	55°C	681pb

Obs: Abreviaturas (em ingles): F, “forward”; R, “reverse”; TA, temperatura de anelamento utilizada; pb, pares de base. A sequência que corresponde ao sítio de restrição BamHI está sublinhada e a sequência que corresponde ao sítio de restrição KpnI está em itálico.

O resultado da amplificação foi visualizado após eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1mM EDTA) marcado com GelRed™ (Biotium, Inc). Após a confirmação dos amplicons nos tamanhos esperados, as bandas foram excisadas do gel e purificados utilizando-se o kit “GFxPCR DNA e gel band purification” (GE Healthcare), sendo os produtos obtidos quantificados em espectrofotômetro pela razão de absorbância a 260nm e 280nm (respectivamente DNA e RNA).

4.4 CLONAGEM

Ambos insertos purificados e o vetor pAE (Ramos et al., 2004) foram digeridos com as enzimas de restrição BamH e KpnI para que apresentassem extremidades coesivas possibilitando hibridização. O vetor estabelecido para clonagem foi o pAE, 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 controlado pelo promotor do fago T7, que transcreve o RNA (e consequentemente a produção da proteína recombinante) somente na presença da T7 RNA polimerase.

Após a digestão enzimática, as amostras dos insertos e do vetor foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 1% e então as bandas de interesse foram purificadas utilizando-se o kit “GFX PCR DNA Gel Band Purification” (GE Healthcare). A ligação dos insertos ao vetor foi realizada em uma reação contendo inserto:vetor em uma proporção de 10:1. Incubaram-se o inserto e vetor por 10 minutos a uma temperatura de 65 °C seguido de

incubação em banho de gelo por 5 minutos, seguido pela adição da enzima T4 DNA ligase (Amersham Pharmacia Biotech, Inc) e incubou-se por 2 horas a 37 °C.

Bactérias competentes *E. coli* DH5 α foram transformadas por choque térmico com o plasmídeo recombinante, plaqueadas em meio Luria-Bertani com ampicilina (0,1%) e incubadas a 37 °C por 16 h. Para a confirmação da transformação, algumas colônias foram selecionadas, inoculadas em 3 mL de meio de cultura e incubadas a 37 °C, sob agitação, por 16 h. Em seguida, 300 μ L de cada inóculo foram centrifugados a 11.300 x g, por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 50 μ L de água deionizada. Adicionaram-se 20 μ L de tampão de carregamento 10X (0.19% azul de bromofenol, 0.425 xileno cianol e 50% glicerol) e 28 μ L de solução fenol-clorofórmio (proporção 1:1). Após a homogeneização com o auxílio do agitador, as amostras foram centrifugadas a 11.300 x g por 3 minutos, e a fase superior contendo o plasmídeo foi analisada por eletroforese de gel de agarose 1%.

Os DNAs plasmidiais presumivelmente positivos para a presença do inserto foram recuperados usando o kit illustra plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare) e analisados em eletroforese em gel de agarose 1% após a restrição enzimática usando as enzimas de restrição BamHI e KpnI, com a finalidade de verificar a presença do inserto.

4.5 SEQUENCIAMENTO DO CLONE

Os cromatogramas foram analisados em dois programas distintos, MzMine e Xcalibur. Através do MzMine os cromatogramas dos extratos foram decoluidos, picos idênticos nos diferentes extratos foram alinhados, espaço vazios preenchidos, substâncias do branco excluídas e os isótopos eliminados. Após o tratamento dos cromatogramas, foi utilizado os bancos de dados Dictionary of Natural Products© (DNP) e Library of Natural Products from Asteraceae (LINPA) para a desrepliação.

Os clones positivos tiveram seus DNAs sequenciados pelo método de terminação da cadeia (Sanger et al., 1977) utilizando o sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster city, CA), a partir dos oligonucleotídeos T7 e pAER (abaixo).

T7 forward: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

pAE R reverse: 5' CAGCAGCCAACTCAGTTCCT 3'

A reação de amplificação foi realizada de acordo com as recomendações da fabricante, empregando 500 ng de DNA molde, 3,2 pmoles de oligonucleotídeos e 2 μ L do tampão BigDye® (PE Applied Biosystems) que contém ddNTPs marcados com fluoróforos, dNTPs e Taq DNA polimerase, em volume final de 20 μ L. A reação foi realizada em termociclador seguindo a rotina de 40 ciclos de 94° por 10 segundos; 50°C por 20 segundos; 60°C por 4 minutos.

Os cromatogramas obtidos foram analisados com auxílio do servidor público BLAST. O sequenciamento dos plasmídeos teve o intuito de verificar se a ligação do inserto foi correta, apresentando todos os componentes de montagem do plasmídeo para a expressão da proteína recombinante e se não houve comprometimento da recombinação por qualquer tipo de mutação no DNA.

4.6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPL31 RECOMBINANTE

A expressão da proteína recombinante LipL31 foi feita utilizando-se a cepa *E. coli* DE3 Star pLysS. O pré-inóculo saturado foi diluído 20 vezes para o volume final de 600 mL de meio LB (100 μ g/mL ampicilina e 34 μ g/mL cloranfenicol) e adicionou-se 1 mM de IPTG para a indução da expressão da recombinante, por 4 horas a 37°C, sob agitação. Em seguida, as culturas induzidas foram centrifugadas (3.075 x g; 15 minutos; 4°C) descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensionado em tampão de lise e sonificado para o rompimento celular e liberação das proteínas recombinantes. O lisado foi centrifugado e o sobrenadante foi coletado para purificação.

A purificação da proteína recombinante 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 previamente 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. A eluição da proteína recombinante ocorreu com solução de 1 M de imidazol e 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 transferidas para membrana de nitrocelulose, seguido pelo bloqueio da membrana com PBSTween 20 0,05% (PBS-T) suplementado com 10% de leite em pó desnatado (PBS-T/leite). Após sucessivas lavagens,

adicionou-se solução de anticorpo IgG monoclonal anti-polihistidina (1:10000, Sigma) em PBS-T/leite. Para a detecção, foram utilizados o substrato SuperSignal West Dura (Thermo Scientific) e o fotodocumentador ImageQuant modelo LAS 400 (GE Healthcare).

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

4.7 ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR

A proteína recombinante foi dialisada com tampão sódio-fosfato (Na_2HPO_4 0,5 M; NaH_2PO_4 1M) à 25°C, efetuando-se três trocas deste tampão. As espectroscopias circulares foram medidas usando uma cubeta de 1 mm de caminho ótico em intervalos de 0,5 nm/s e captadas em espectropolarímetro de modelo Jasco J-810 (Japan Spectroscopic, Japão).

Os espectros expressos em termos de elipticidade molar residual foram submetidos a uma análise no programa CAPITO (<http://capito.nmr.leibniz-fli.de/>) (Wiedemann et al., 2013), que calcula as porcentagens das estruturas secundárias da proteína a partir dos dados experimentais de elipticidade obtidos.

4.8 AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Camundongos BALB/c fêmeas (18-22 g) foram imunizados com 10 µg de proteína recombinante com 12,5% de Alhydrogel [2% $\text{Al}(\text{OH})_3$; Brenntag Biosector, Dinamarca], usado como adjuvante vacinal. As imunizações foram administradas no dorso via subcutânea. Outras duas imunizações de reforço foram realizadas com intervalos de 15 dias entre cada imunização.

Os animais foram sangrados a cada 15 dias após as imunizações via plexo submandibular; o sangue coletado foi incubado a 4° C por 30 minutos e centrifugado a 2000 x g por 5 minutos, e a fração do soro armazenada a -20°C. Os soros obtidos foram avaliados por ELISA para a determinação do título dos anticorpos contra a proteína recombinante. Foram adicionados 50 µL de proteína recombinante por poço (à uma concentração de 0,5 µg/µL) em placa de 96 poços (Costar® High binding, Corning Incorporated, EUA). A proteína foi incubada a 4°C por 16 horas e então a placa foi lavada com PBS-T. Os poços foram tratados com 200 µL da solução de bloqueio PBS-T/leite durante 2 horas a 37 °C. Incubaram-se estes soros por 1 hora para a adsorção de quaisquer anticorpos contaminantes produzidos contra proteínas de E. coli que poderiam estar contidos nas alíquotas de proteína recombinante

(Gruber e Zingales, 1995). Então foram feitas diluições seriadas iniciando em 1:2000 até 1:4096000 dos soros anti-LipL31 recombinante produzidos em camundongos em solução de bloqueio acrescida de extrato de *E. coli* (10% v/v).

Adicionou-se em seguida 50 μ L das respectivas diluições por poço e foi feita a incubação por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada e incubada com 50 μ L por poço de solução de PBS-T 10% leite desnatado contendo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:10000 v/v, Sigma).

A reação enzimática foi revelada pela adição de 100 μ L de uma solução contendo 1 mg/mL de OPD (σ -fenilenodiamina diidrocloreto, Sigma) diluído em tampão citrato-fosfato pH 5,0 contendo 1 μ g/mL de peróxido de hidrogênio. Após 10 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 50 μ L de solução H₂SO₄ 4 N. A reação foi analisada mensurando a absorvância no comprimento de onda de 492 nm. O título individual foi determinado como sendo o inverso da maior diluição do soro com valor de densidade óptica (DO) maior que 0,1.

4.9 AVALIAÇÃO DO ESTADO OLIGOMÉRICO DA PROTEÍNA

Para avaliação da conformação oligomérica da proteína recombinante foi feita a separação por cromatografia de exclusão molecular (ou cromatografia de gel filtração) injetada na coluna HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg (Sigma-Aldrich) previamente equilibrada com o buffer A, e acoplado ao AKTA Prime Plus (GE Healthcare) para a separação por exclusão molecular. Após a cromatografia, as alíquotas referentes aos picos referentes às prováveis conformações quaternárias das proteínas recombinantes foram coletadas e avaliadas por SDS-PAGE para identificação da massa molecular das proteínas contidas.

Outro ensaio foi realizado utilizando duas alíquotas de mesmo volume de proteína recombinante foram submetidas a tratamentos distintos; em uma alíquota, a amostra foi misturada com tampão de corrida contendo SDS e β -mercaptoetanol e foi tratada termicamente a 96 °C por 5 minutos, e a outra amostra foi misturada apenas com tampão de corrida e sem tratamento térmico. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida de 12%, e transferidos para membrana de nitrocelulose para incubação com antissoro contra a proteína recombinante (1:3000), seguido pela incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:10000).

4.10 ENSAIO DE LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

As bactérias *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 sonicada e intacta, e *L. biflexa* sorovar Patoc foram imobilizadas em microplacas (1×10^9 bactérias/poço) e incubadas à 4° por 16 horas. Lavou-se três vezes com PBS na concentração final de 50 mM de NaCl, seguido pelo bloqueio com solução de PBS com 1% BSA (m/v) por 2 horas a 28°C.

Para a detecção das proteínas na bactéria, foi feita incubação com os antissoros homólogos produzidos em camundongos BALB/c ou LipL31 (Haake e Matsunaga, 2002), utilizando a diluição na qual a densidade óptica foi igual a 1 quando testou-se estes antissoros contra as respectivas proteínas recombinantes. As leptospiros foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com 100 µL da solução de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase em PBS (proporção 1:5000; v/v) e incubados por 1 hora a 28 °C. As leptospiros foram lavadas três vezes com PBS e a revelação da reação foi realizada conforme descrito no item 3.8.

Como controle experimental, foi utilizado soro policlonal contra a proteína LipL31, uma proteína de membrana interna (controle negativo), e foram utilizados dois tratamentos controle, o primeiro omitindo os antissoros e o outro sem a imobilização de leptospiros, para que se pudesse descontar quaisquer sinais inespecíficos.

Para as análises estatísticas, a média dos valores de absorbância do tratamento completo foi comparada com os controles negativos, por teste t-Student, e o p-valor abaixo de 5% foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA DA LipLL31

O estudo de proteínas de leptospiros são importantes para identificação de possíveis interações entre a bactéria e o hospedeiro. Além disso, pouco se sabe sobre a proteína codificada pelo gene, portanto softwares ajudam nas análises iniciais.

O software LipoP para bactérias gram negativas identificou a LipL31 como uma lipoproteína de membrana interna com sítio de clivagem entre os aminoácidos 19 e 20 pela

enzima signal peptidase II (SpII). O programa PSORT de predição de localização celular apresentou como resultado proteína de membrana interna, enquanto no CELLO a predição foi de proteína citoplasmática. Apesar dos resultados distintos, é evidente que a proteína codificada pelo gene LIC11456 é predita como lipoproteína de membrana interna.

Uma análise de conservação da proteína nas diferentes cepas e sorovares de *Leptospira* foi realizado através do alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína sem peptídeo sinal na ferramenta BLAST. O BLAST 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 filograma ilustrado da Figura 2. Observa-se maior identidade do gene LIC11456 com as espécies patogênicas do que com as saprófitas, sendo a menor similaridade com as espécies *L. vanthiellii* e *L. wolbachii*.

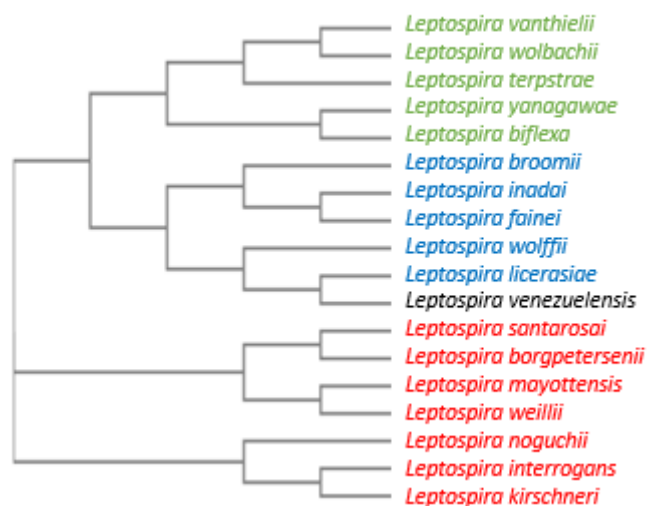


Figura 2. Análise da conservação da sequência entre espécies de *Leptospira* por alinhamento múltiplo usando Clustal Omega. A sequência alvo foi analisada por BLASTp com sequências disponíveis no banco de dados GenBank e foram usadas para realizar alinhamentos múltiplos no Clustal Omega. Os filogramas gerados mostram um alto grau de similaridade entre espécies patogênicas enquanto que as espécies saprofíticas apresentaram uma baixa taxa de conservação das sequências alvo.

5.2 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM

A sequência de DNA correspondente ao gene que codifica a proteína LipL 31 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 (Figura 2). A amplificação demonstrou o tamanho de banda esperado para o gene da proteína LipL31.

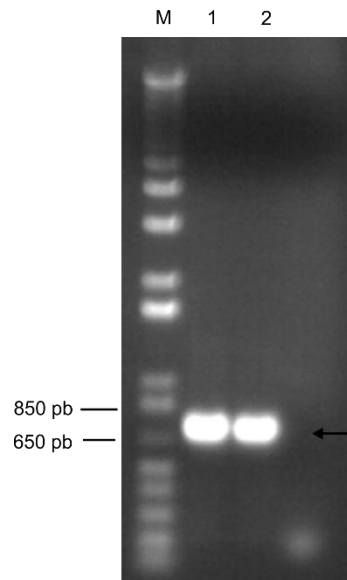


Figura 2. Análise dos amplicons após PCR por eletroforese em gel de agarose 1%. M) marcador molecular 1kb DNA ladder; 1-2) Amplicon do gene LIC 11456; 3) controle negativo sem DNA genômico.

Os amplicons obtidos da PCR foram clonados no vetor pAE, clonagem direta, e inserido em células *E. coli* StarpLys, e todas as colônias crescidas em placa foram avaliadas por meio da extração de DNA plasmidial, e comparação de tamanho do DNA do vetor e inserto. O vetor pAE, por seu tamanho reduzido, possibilita a clonagem de insertos maiores, apresenta uma sequência que adiciona seis histitinas na porção N-terminal da proteína recombinante que auxilia na purificação de proteínas logo após o códon de início ATG, além disso, *E. coli* transformadas com pAE produzem um maior número de cópias de plasmídeos facilitando a clonagem e sequenciamento (Ramos et al.,2004). De 14 colônias testadas da placa de proporção 10:1 de inserto/vetor três deram positivas para a presença do inserto.

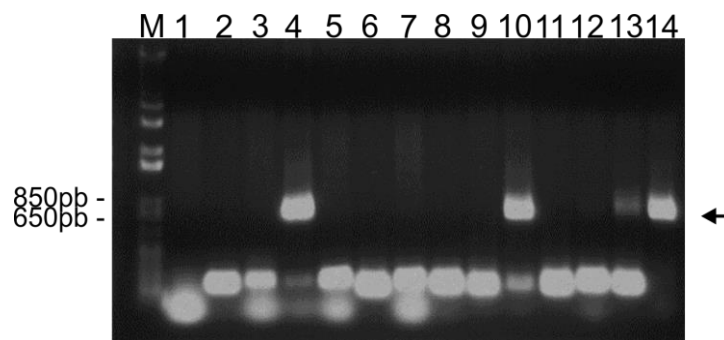


Figura 3. Análise dos clones obtidos após transformação com o plasmídeo pAE recombinante por eletroforese em gel de agarose. M) marcador molecular 1Kb Plus DNA ladder; 1) controle negativo correspondente ao vetor pAE selvagem; 2-14) diferentes clones selecionados para análise. A seta indica os clones selecionados por meio da massa molecular plasmidial referente ao vetor pAE somado ao inserto.

A construção plasmidial das colônias positivas foi sequenciada para confirmação se estavam em fase correta de leitura e não apresentavam mutações. No sequenciamento da colônia escolhida foi possível observar todos os elementos da clonagem (sequência de polihistidina, sítios de restrição enzimática, gene da proteína, identidade com o gene matriz) confirmando sua viabilidade.

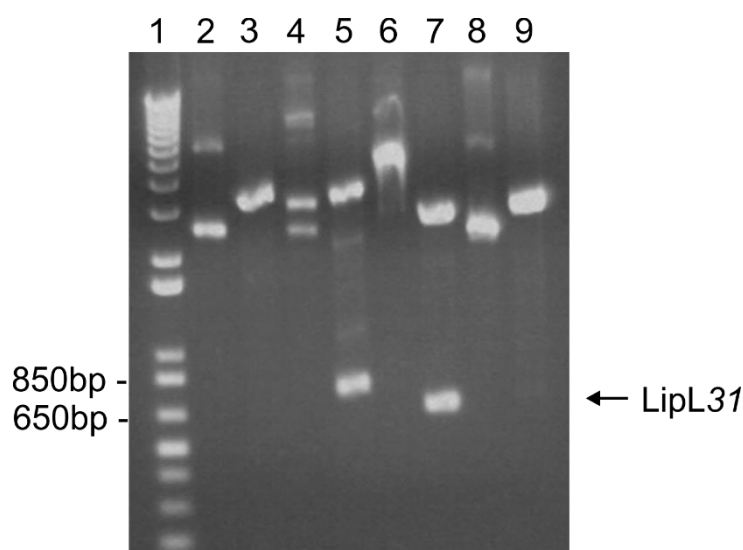


Figura 4. Ensaio de restrição enzimática para confirmação da presença do inserto nos clones selecionados. 1) marcador molecular 1Kb Plus DNA ladder; 2) controle negativo correspondente ao plasmídeo circular do vetor pAE selvagem; 3) controle negativo digerido pelas enzimas BamHI e KpnI; 4,6 e 8) colônias selecionadas não digeridas; 5, 7 e 9) colônias selecionadas digeridas por BamHI e KpnI.

5.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Foram analisados por ferramenta de bioinformática características da proteína recombinante com intuito de otimizar as etapas de expressão e purificação. O software ProtParam forneceu dados de Ponto Isoelétrico (PI) da proteína, sua massa molecular e a porcentagem de aminoácidos. Em seguida foi realizado um estudo de indução inicial para estabelecer o tempo de crescimento da bactéria e quantidade de indutor a ser utilizado. A indução à expressão da proteína ocorreu na fase exponencial, em cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS, com concentrações de 0,1 mM e 1mM de IPTG. A cepa utilizada garante uma maior estabilidade do RNA mensageiro produzido para a tradução de proteínas

recombinantes, pois conta com uma mutação no gene da RNase, envolvida na degradação do RNA mensageiro.

Após a indução, as bactérias foram lisadas e as frações proteicas obtidas (solúvel e insolúvel) analisadas em gel de SDS-PAGE (12%) e em ensaio de Western blotting utilizando anticorpo monoclonal anti-His para confirmar a expressão da proteína.

Apesar da massa molecular da proteína ser de 25 kDa, o alto número de aminoácidos aspartato e glutamato aumentam a interação da proteína com o gel de poliacrilamida diminuindo seu deslocamento. Portanto a migração da proteína recombinante é 31 kDa, característica que lhe atribui o nome de LipL31, lipL referente a lipoproteína e 31 ao tamanho de migração.

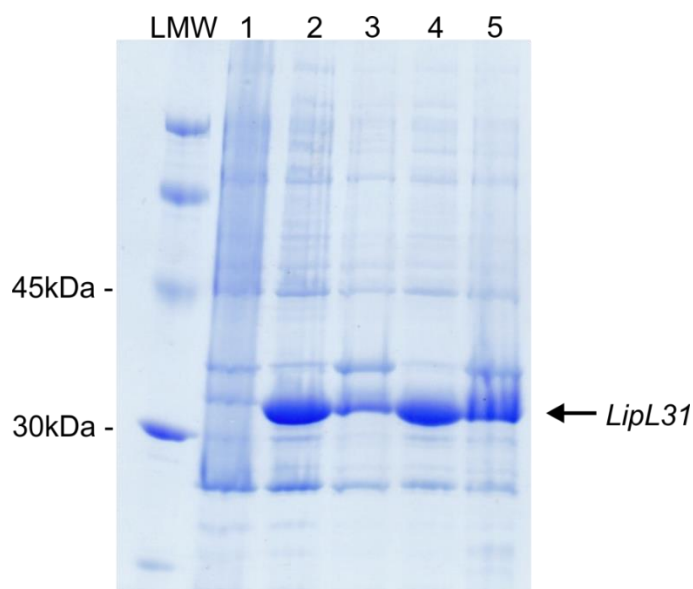


Figura 5. Análise da expressão da proteína recombinante por SDS-PAGE. LMW) padrão de massa molecular (kDa); 1) sobrenadante não induzido; 2) sobrenadante induzido com 0,01mM IPTG; 3) fração insolúvel induzida com 0,01mM IPTG; 4) sobrenadante induzido com 0,1mM IPTG; 5) fração insolúvel induzida com 0,1mM IPTG. A seta indica a proteína recombinante expressa com massa molecular esperada de 31 kDa.

5.4 PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A fração solúvel foi identificada como a porção com maior número de proteína, portanto a mesma foi usada para a purificação da proteína recombinante. A purificação ocorreu por cromatografia de afinidade ao metal (Ni⁺), na qual 6 resíduos de histidina presente no vetor pAE tem afinidade (adicionada na porção N-terminal da proteína recombinante pelo vetor), retendo então a proteína enquanto as impurezas, que se ligam

fracamente à coluna, são retiradas em lavagens subsequentes com tampão de variadas concentrações de imidazol. Para eluir a proteína da coluna, a concentração de imidazol na solução tampão é aumentada para 1M, iniciando uma competição da proteína recombinante com imidazol e com as histidinas da proteína, liberando a mesma da coluna. As frações coletadas durante o processo de purificação foram analisadas por *immunoblotting* conforme ilustrado na Figura 7.

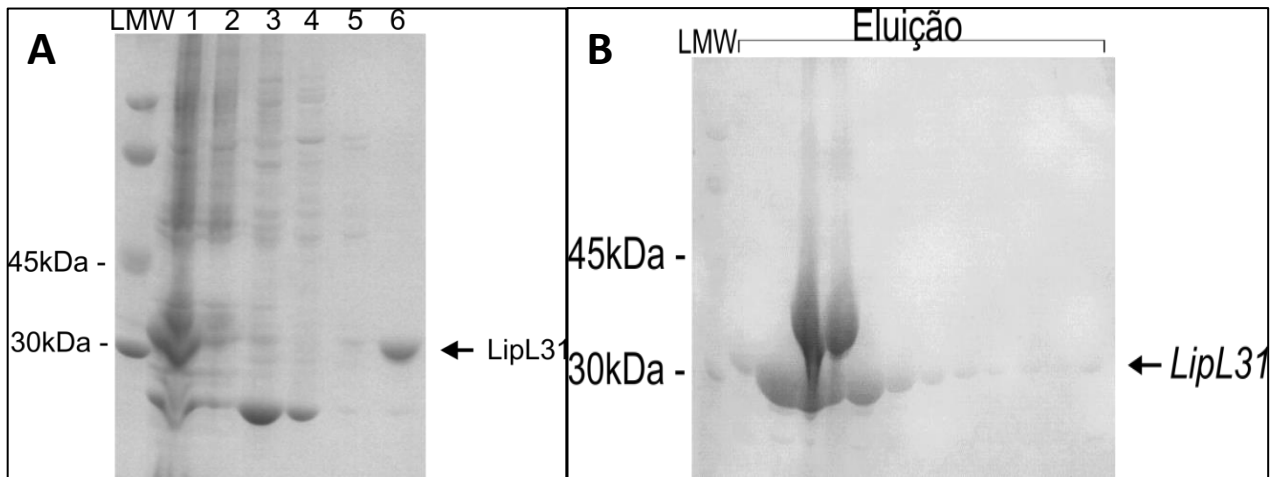


Figura 6. Análise da presença da proteína recombinante nas alíquotas pós purificação. Imagem A: 1) fração solúvel antes da purificação; 2) fração coletada da coluna logo após inserção da amostra; 3) fração eluída com 5mM de imidazol; 4) fração eluída com 20mM de imidazol; 5) fração eluída com 40mM de imidazol; 6) fração eluída com 60mM de imidazol. Imagem B: Alíquotas coletadas durante eluição com 1M de imidazol.

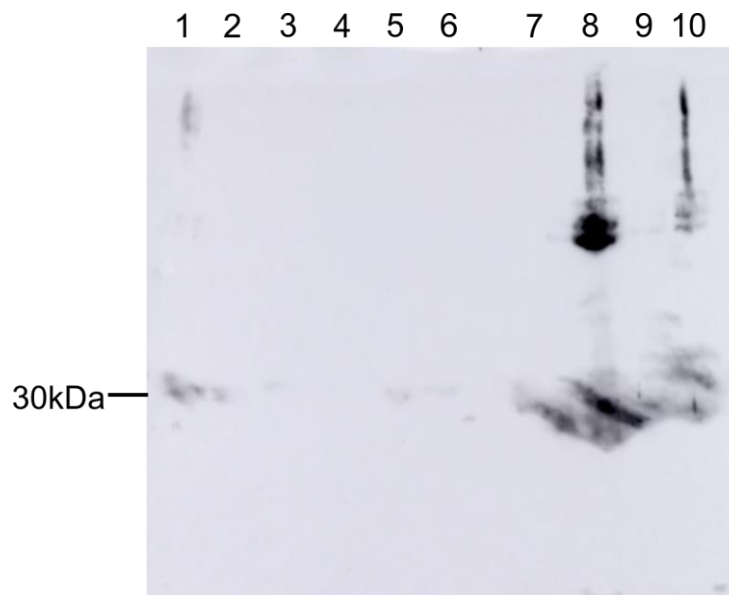


Figura 7. Análise da presença da proteína recombinante por Western blotting nas alíquotas pós purificação. 1) fração solúvel antes da purificação; 2) fração coletada da coluna logo após inserção da amostra; 3) fração eluída com 5mM de imidazol; 4) fração eluída com 20mM de imidazol; 5) fração eluída com 40mM de imidazol; 6) fração eluída com 60mM de imidazol; 7-10) alíquotas da fração eluída com 1M de imidazol.

É possível observar uma grande concentração da proteína principalmente nas primeiras alíquotas após a purificação, inclusive nota-se uma porção reconhecida próximo à 66 kDa indicando possíveis dímeros da proteína recombinante. A proteína purificada foi submetida à diálise, substituindo a solução de imidazol por tampão PBS e quantificadas por diferentes métodos, ensaio de Bradford, análise densitométrica das bandas em gel de poli-acrilamida e por espectrofotometria, determinando uma concentração de 0,9ug/uL.

A técnica de dicroísmo circular (CD) foi aplicada para estudar a conformação e estabilidade da proteína após o processo de purificação, desnaturação e renaturação. As informações obtidas são importantes para se compreender as funções da proteína. Foi feita a análise dos 10 espectros gerados através da absorção diferencial de luz circular polarizada no programa CAPITO (Wiedemann; Bellstedt; Gorlach, 2013).

No diagrama obtido a proteína recombinante apresenta dois picos negativos entre 200 a 230 nm e um pico positivo entre 190 a 200 nm característico da predominância de α -hélice (71%), confirmado também na predição *in silico* (65%) da estrutura da proteína LipL31. Portanto, a estrutura da proteína recombinante se assemelha a proteína nativa da leptospira.

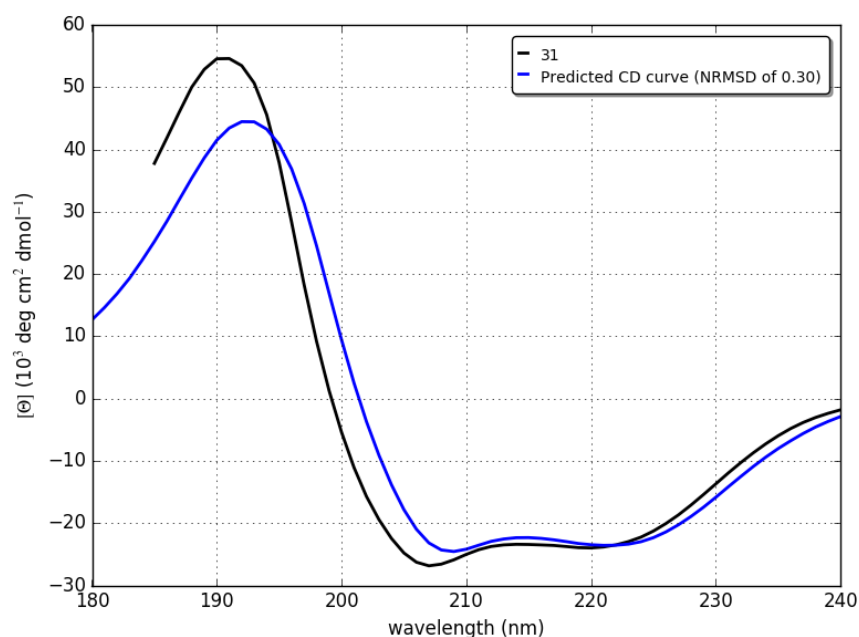


Figura 8. Espectro do dicroísmo circular. A obtenção dos espectros foi feita em um espectropolarímetro usando uma célula de 1mm de caminho óptico com intervalos de 0,5nm.

Tabela 2. Predição das estruturas secundárias da proteína secundária.

	α -hélice	Folha β	Irregular
Predito	65%	20%	15%
Experimental	71%	1%	51%

5.5 AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM CAMUNDONGOS

A imunização dos camundongos BALB/c ocorreu com 10ug da proteína purificada acrescida de adjuvante por via subcutânea. A indução de resposta imune foi avaliada através da presença de anti-LipL31 nos soros obtidos.

O título de anticorpo, estabelecido pelo inverso da última diluição do soro cuja absorbância ficou acima do valor limítrofe de 0,1 (492nm) gerado em cada uma das imunizações. A proteína foi capaz de produzir altos títulos de IgG após a terceira imunização (256 mil de título na terceira sangria e 213 mil na quarta sangria) e os soros reagiram com a proteína purificada através do teste de reatividade por *Western Blotting* nos ensaios subsequentes.

5.6 AVALIAÇÃO DO ESTADO OLIGOMÉRICO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Após a purificação das proteínas pela cromatografia de afinidade, a proteína recombinante também foi submetida a uma coluna de gel-filtração, técnica que permite a purificação de proteínas através da diferença de tamanho diretamente relacionado com a massa molecular. A coluna cromatográfica é composta por polímero poroso que interage com moléculas pelo tamanho, quanto maiores às moléculas, menos interação ocorre e menor é tempo de retenção. O inverso ocorre para proteínas de menor tamanho.

A partir dessa purificação, foi realizado por western blotting um ensaio para identificação dos estados oligoméricos da proteína recombinante, em que a mesma recebeu

dois tipos de tratamento, desnaturante e não-desnaturante e foi identificada tanto pelo antissoro policlonal obtido da imunização dos camundongos. Neste ensaio foi possível identificar duas bandas, ressaltadas no tratamento não desnaturado, uma mais fraca em 31 kDa e outra intensa próximo a 62 kDa, provavelmente a estrutura dimérica da LipL31. O inverso também ocorreu para o tratamento de desnaturação da proteína.

A estrutura dimérica é provavelmente mais estável e a forma natural de apresentação da proteína.

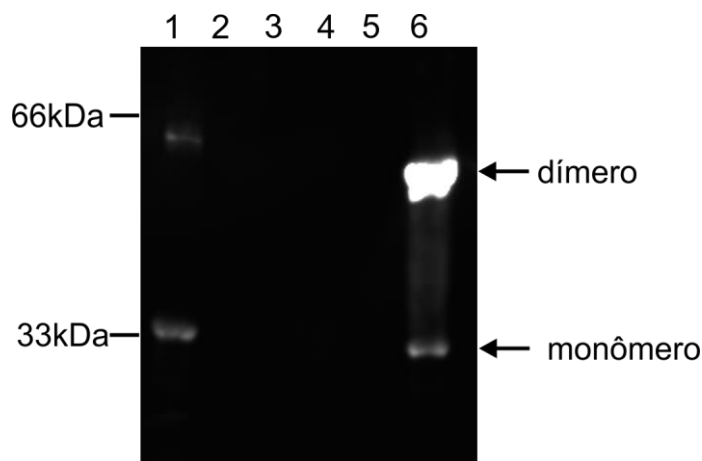


Figura 9. Análise estrutural da proteína por western blotting. Amostras de proteínas recombinantes foram separadas por SDS-PAGE resultando em bandas de proteínas desnaturadas por aquecimento a 96 °C e tratamento das amostras com β -mercaptoetanol e não desnaturadas (amostras sem tratamento). 1) lipL31 desnaturada; 2) rLIC11711 desnaturada; 3) BSA desnaturado; 4) lipL31 não desnaturada; 5) rLIC11711 não-desnaturada; 5) BSA não desnaturada.

5.7 ENSAIO DE CONSERVAÇÃO ANTIGÊNICA DA PROTEÍNA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Leptospira*

A presença da proteína foi avaliada em 3 diferentes espécies e sorovares de *Leptospira*, sendo elas *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1, *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 e *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fio Cruz L1-130, através da interação de anticorpo com a proteína por western blotting. Os extratos de *Leptospira* foram separados por SDS-PAGE 12% e transferidos para membrana de nitrocelulose.

Foi possível observar uma maior reatividade do antissoro com a *L. interrogans*, espécie patogênica, principalmente sorovar Copenhageni cepa Fio Cruz L1-130, enquanto que na espécie saprófita não houve nenhuma interação.

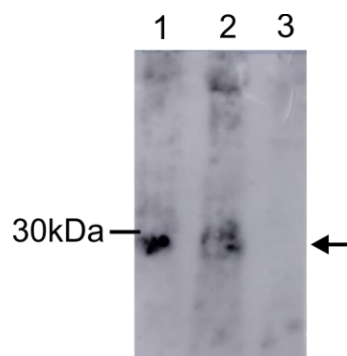


Figura 10. Avaliação da conservação antigênica da proteína lipL31 em diferentes espécies de *Leptospira*. A proteína foi reconhecida pelo antissoro policlonal obtido de camundongos em bactérias lisadas por sonicador. 1) *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fio Cruz L1-130; 2) *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20; 3) *L. biflexa* sorovar Patoc; a seta indica a altura da porção correspondente à lipL31.

5.8 ENSAIO DE LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA LIPL31

A proteína lipL31 foi descrita como proteína de membrana interna pela análise in silico e para comprovação desta informação foi feito o imunoenensaio de localização por ELISA em bactéria intacta e lisada *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20. A detecção da proteína nativa foi realizada através da interação do antissoro homólogo gerado contra a proteína recombinante.

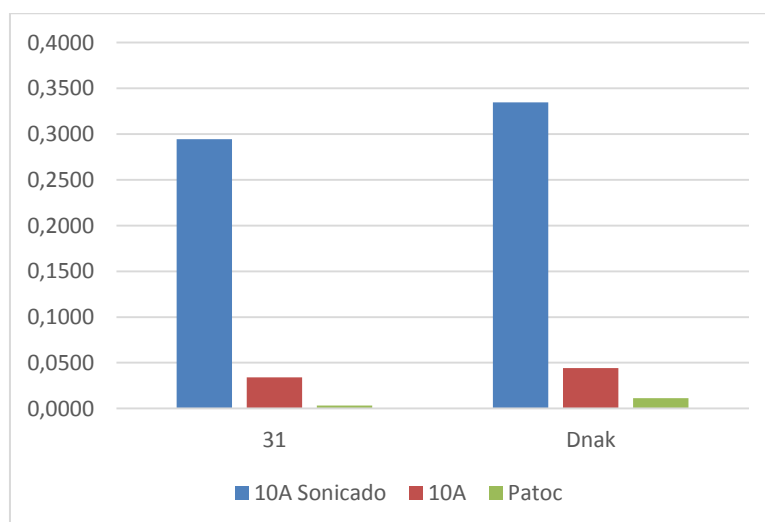


Gráfico 2. Análise de localização celular da proteína nativa lipL31. Para a detecção da proteína nativa foi utilizado o soro anti-proteína recombinante produzidos em camundongos seguido do reconhecimento pelo anticorpo secundário IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase.

Os resultados obtidos sugerem que a proteína lipL31 se encontra na membrana interna, pois apresentou maior sinal de reatividade para a bactéria lisada do que para a intacta e também obedece ao padrão da proteína DnaK conhecidamente de membrana interna. Os resultados foram analisados estatisticamente por teste T-student e não houve diferença estatística entre LipL31 e Dnak.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados experimentais obtidos pode-se concluir que a proteína LipL31 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni podem ser expressas na fração solúvel em forma recombinante, grande facilitador para obtenção da mesma. Os ensaios de estrutura revelaram uma proteína composta em sua maioria por α -hélice, e que deu início a estudos mais aprofundados sobre sua estrutura através da cristalização da proteína, que estão sendo realizados no presente momento. As análises também comprovaram a localização da proteína em membrana interna possibilitando seu uso como controle em ensaios de localização de outras proteínas.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B. Vaccines against leptospirosis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 387, p. 251- 72, 2015.
- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol**, v. 140, n. 3-4, p. 287-96, Jan 2010.
- BHARTI, Ajay R et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 3, n. 12, p.757-771, dez. 2003.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Leptospirese: Situação epidemiológica do Brasil no período de 2007 a 2016, v.49 n.41. Outubro, 2018.
- 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.
- 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.

- DELLAGOSTIN, ODIR A et al. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. **International journal of molecular sciences** vol. 18,1 158. 14 Jan. 2017.
- 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.
- GRUBER, A.; ZINGALES, B. Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. **Biotechniques**, v. 19, n. 1, p. 28, 30, Jul 1995.
- HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v. 146 (Pt 7), p. 1491-504, Jul 2000.
- HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 387, p. 65-97, 2015.
- HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. **Infect Immun**, v. 70, n. 9, p. 4936- 45, Sep 2002.
- HANAHAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. **J Mol Bio**, v. 166, n.4, p. 555-580, 1983.
- 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.
- 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.
- MARTÍNEZ, R.; PÉREZ, A.; QUIÑONES, M. C.; CRUZ, R.; ALVAREZ, A.; ARMESTO, M.; FERNÁNDEZ, C.; MENÉNDEZ, J.; RODRÍGUEZ, I.; BARÓ, M.; DÍAZ, M.; RODRÍGUEZ, J.; SIERRA, G.; OBREGÓN, A. M.; TOLEDO, M. E.; FERNÁNDEZ, N. 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. LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. **Microbiology**, v. 152, n. Pt 12, p. 3777-86, Dec 2006.
- NAIMAN, B. M. et al. Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. **Infect Immun**, v. 70, n. 11, p. 6147-57, Nov 2002.
- PINNE, M.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Leptospiral outer membrane protein microarray, a novel approach to identification of host ligand-binding proteins. **J Bacteriol**, v. 194, n. 22, p. 6074-87, Nov 2012.
- PINNE M, HAAKE DA. "A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*" *PloS one* vol. 4,6 e6071. 29 Jun. 2009.
- Zeng, LingBing 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. 8 396. 14 Mar. 2017.
- 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.

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.

SMYTHE, L. et al. Classification of Leptospira genomospecies 1, 3, 4 and 5 as Leptospira alstonii sp. nov., Leptospira vanthielii sp. nov., Leptospira terpstrae sp. nov. and Leptospira yanagawae sp. nov., respectively. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 63, n. Pt 5, p. 1859-62, 2013.

TAKAFUJI, Ernest T. et al. An Efficacy Trial of Doxycycline Chemoprophylaxis against Leptospirosis. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 310, n. 8, p.497-500, 23 fev. 1984.,3

VERNEL-PAUILLAC, Frédérique; WERTS, Catherine. Recent findings related to immune responses against leptospirosis and novel strategies to prevent infection. **Microbes And Infection**, [s.l.], v. 20, n. 9-10, p.578-588, out. 2018. Elsevier BV.

WIEDEMANN, C.; BELLSTEDT, P.; GÖRLACH, M. CAPITO--a web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data. **Bioinformatics**, v. 29, n. 14, p. 1750-7, Jul 2013.

YANAGIHARA, Y.; VILLANUEVA, S. Y.; YOSHIDA, S.; OKAMOTO, Y.; MASUZAWA, T. Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, p. 399-413, 2007.