

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Expressão heteróloga de proteínas de *Leptospira interrogans*
envolvidas na captação de fatores de regulação do sistema complemento

Éverton Burlamarque Bettin

Pelotas, 2015

Éverton Burlamarque Bettin

**Expressão heteróloga de proteínas de *Leptospira interrogans* envolvidas na
captação de fatores de regulação do sistema complemento**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

B565e Bettin, Éverton Burlamarque
Expressão heteróloga de proteínas de *Leptospira interrogans* envolvidas na captação de fatores de regulação do sistema complemento / Éverton Burlamarque Bettin. – 57f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015. – Orientador Odir Antônio Dellagostin.

1.Biotecnologia. 2.Vacina recombinante. 3.lcpA.
4.Sistema complemento. 5.Leptospirose. 6.Leptospiral immunoglobulin-like. 7.lenA. I.Dellagostin, Odir Antônio. II.Título.

CDD: 614.56

Banca examinadora:

Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto, Universidade Federal de Pelotas

Professor Dr. Alan John Alexander McBride, Universidade Federal de Pelotas

Professor Dr. Odir Antônio Dellagostin, Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, por sempre me incentivarem, por permitirem a minha formação e construírem toda a base para a minha jornada, por me acompanharem na busca dos meus sonhos, sempre depositando toda a confiança em mim;

À minha namorada, Letícia, por estar junto a mim durante toda a minha graduação, por dividir comigo os momentos de alegria e entusiasmo, os desafios e preocupações, por todo amor, carinho e incentivo dado, sendo sempre a minha maior companheira;

À Universidade Federal de Pelotas e, em especial, ao Centro de Biotecnologia do CDTec, por possuírem um curso de qualidade, sendo capaz de construir toda a minha admiração e entusiasmo pela biotecnologia através de professores altamente qualificados;

Ao meu orientador, Odir Antônio Dellagostin pela atenção e dedicação e por ter me transmitido conhecimentos como pesquisador e me instruído como pessoa;

Aos pesquisadores do Laboratório de Vacinologia, por tornarem prazeroso o meu ambiente de trabalho, por todos os ensinamentos, por sempre me auxiliarem, dividindo meus desafios e conquistas. Em especial aos colegas, Michele, Ivânia, Karina, Amilton e Carlos, que tiveram participação direta na realização dos meus projetos de pesquisa;

Aos meus colegas da 5ª turma de Biotecnologia, por estarem comigo em todos os momentos desse percurso, os quais levarei para sempre;

À CAPES e ao CNPq agradeço pela concessão das bolsas de Iniciação Científica.

Obrigado!

“Se, no fim, o meu melhor não for o suficiente, pelo menos poderei olhar para trás e dizer que não tive medo de tentar.”

(JORDAN, 2009, p.34)

Resumo

Bettin, Éverton Burlamarque. **Expressão heteróloga de proteínas de *Leptospira interrogans* envolvidas na captação de fatores de regulação do sistema complemento**. 2015. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose está entre as principais zoonoses em termos de morbidade e mortalidade em humanos. A vacinação humana contra a leptospirose é existente em poucos países e apresenta diversas limitações. A utilização de moléculas envolvidas na evasão do sistema complemento em formulações vacinais é uma estratégia destacada por diferentes autores. As proteínas de membrana externa LigA, LigB, LenA e LcpA de *Leptospira interrogans* já demonstraram capacidade de adesão à fatores de regulação do sistema complemento. Este trabalho descreve a expressão heteróloga das proteínas LigBNI, LenA e LcpA de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, para a avaliação da capacidade de induzirem uma resposta imune protetora contra a leptospirose quando combinadas. Foram desenhados *primers* para a amplificação dos genes *ligBNI*, *lenA* e *lcpA*. Após amplificação, os genes foram clonados em vetor pAE. As proteínas foram expressas de forma heteróloga em *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star e purificadas através de cromatografia de afinidade em coluna de Níquel-Sepharose. As proteínas foram caracterizadas através de Western Blot (WB) quanto ao reconhecimento por anticorpo monoclonal anti-6xHIS. A metodologia utilizada nesse trabalho permitiu realizar com êxito a clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes de interesse. As proteínas apresentaram o peso molecular esperado em WB. A obtenção destas três proteínas permite a realização de ensaios futuros buscando promover a suscetibilidade do patógeno ao complemento.

Palavras-chave: vacina recombinante; sistema complemento; leptospirose; leptospiral immunoglobulin-like; lenA; lcpA;

Abstract

Bettin, Éverton Burlamarque. **Heterologous expression of *Leptospira interrogans* proteins involved in binding complement system regulation factors.** 2015. 57f.
Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia.
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is among the leading zoonotic causes of morbidity and mortality in humans. Human vaccination against leptospirosis is available in a few countries only and shows several limitations. Many authors highlight the use of vaccines containing proteins involved in avoiding the complement system. *Leptospira interrogans* outer membrane proteins, LigA, LigB, LenA and LcpA can bind to the complement system regulation factors. This study describes *L. interrogans* serovar Copenhageni LigBNI, LenA and LcpA heterologous expression for evaluation of their capacity to induce protective immunity against leptospirosis when combined. Primers were design to amplify *ligBNI*, *lenA* and *lcpA* genes. After amplification, genes were cloned in the pAE vector. The proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star and purified by Niquel-Sepharose column chromatography. Proteins were analyzed by Western Blot (WB) with monoclonal antibody anti-6xHIS. The methodology used in this work allowed the cloning, expression and purification of these recombinant proteins, which showed the correct molecular weight in WB. These proteins will be used in future experiments aiming to render the pathogen susceptible to complemente system activity.

Keywords: recombinant vaccine; complement system; leptospirosis; leptospiral immunoglobulin-like; lenA; lcpA.

Lista de Figuras

Figura 1	Esquematização das vias do sistema complemento.....	23
Figura 2	Representação gráfica da ação das proteínas Len e LcpA na evasão do sistema complemento.	25
Figura 3	Amplicação por PCR dos genes <i>lenA</i> , <i>lcpA</i> , <i>ligBNI</i>	35
Figura 4	Caracterização dos vetores recombinantes através da digestão com as enzimas <i>Bam</i> HI e <i>Kpn</i> I.	36
Figura 5	Purificação das proteínas recombinantes através de cromatografia de afinidade em coluna de sefarose carregada com níquel.	37
Figura 6	Caracterização das proteínas recombinantes através de Western blot.	37

Lista de Tabelas

Tabela 1	Lista de <i>primers</i> utilizados para a amplicação gênica.	31
----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

BIG	Bacterial immunoglobulin-like
C4BP	C4b-Binding protein
CAAT	Teste de aglutinação cruzada
DAB	3,3'-diaminodbenzidine
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMJH	Ellinghause-McCullough Johnson-Harris
FH	Fator H
FHL-1	Factor H Like protein 1
FHR-1	Factor H related protein 1
Ig	Imunoglobulina
IHA	Ensaio de Hemaglutinação Indireta
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria-Bertani
LcpA	Leptospiral complemente factor acquiring protein A
Len	Leptospiral Endostatin-like
Lig	Leptospiral Immunoglobulin-like
LPS	Lipopolissacarídeos
Lsa	Leptospiral surface adhesin
LTB	Enterotoxina Termo-Lábel
MAC	Complexo de ataque à membrana
MASP	MBL-associated serine protease
MBL	Manose binding lectin

NCBI	National Center of Biotechnology Information
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TLR2	Toll-like receptor 2
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF	Fator de necrose tumoral
WB	Western Blot

Sumário

1	Introdução	12
2	Objetivos	14
2.1.	Objetivo Geral	14
2.2.	Objetivos Específicos	14
3	Revisão de literatura	15
3.1.	Leptospiras	15
3.2.	Leptospirose	16
3.3.	Mecanismos de Patogênese das Leptospiras	20
3.4.	Sistema Complemento e Leptospirose	22
3.5.	Leptospiral Immunoglobulin-like	26
3.6.	Leptospiral Endostatin-like	28
3.7.	Leptospiral Complement Regulator Acquiring Protein A	29
3.8.	Outras proteínas	29
4	Metodologia	31
4.1.	Cepas, condições de cultivo e extração do DNA	31
4.2.	Desenho dos primers e amplificação dos genes por PCR	31
4.3.	Clonagem dos genes em vetor pAE	32
4.4.	Transformação de <i>E. coli</i> por eletroporação	32
4.5.	Triagem dos clones recombinantes	33
4.6.	Expressão heteróloga das proteínas rLigBNI, rLenA e rLcpA	33
4.7.	Solubilização e Purificação das proteínas recombinantes	34
4.8.	Caracterização das proteínas por <i>Western Blot</i>	34
5	Resultados	35
5.1.	Construção e clonagem dos genes	35
5.2.	Caracterização dos clones recombinantes	35
5.3.	Expressão e purificação das proteínas recombinantes	36
5.4.	Caracterização das proteínas recombinantes por <i>Western blot</i>	37
6	Discussão	38
7	Perspectivas futuras	40
8	Conclusão	41
	Referências	42

1 Introdução

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Em humanos, a leptospirose pode variar de uma infecção assintomática até uma grave doença, resultando em falência múltipla dos órgãos e morte (MURRAY et al., 2013). Estima-se atualmente mais de um milhão de casos de leptospirose por ano em todo o mundo, levando a aproximadamente 59.000 mortes, tornando esta, uma das principais zoonoses em termos de morbidade e mortalidade no mundo (COSTA et al., 2015).

A utilização de vacinas contra a leptospirose humana é existente em alguns países como China, Cuba, Japão e França. Entretanto, essas vacinas são bacterinas, apresentam efeitos adversos locais e sistêmicos e conferem proteção apenas contra os sorovares que compõem a vacina, não sendo capaz de fornecer uma proteção de amplo espectro nem de longa duração (KOIZUMI e WATANABE, 2005). Buscando sanar as deficiências apresentadas pelas bacterinas, vários antígenos recombinantes têm sido avaliados em vacinas contra essa zoonose, focando principalmente em fatores de virulência presentes na membrana externa (DELLAGOSTIN et al., 2011).

Já se demonstrou um interesse na utilização das proteínas *Leptospiral immunoglobulin-like* (Lig) em formulações vacinais, devido ao seu envolvimento com os mecanismos de patogênese das leptospiros. A expressão dessas proteínas é fortemente induzida pelo incremento da osmolaridade do meio aos níveis fisiológicos do hospedeiro, indicando um envolvimento com os estágios iniciais da infecção (MATSUNAGA et al., 2005). Essas proteínas possuem a capacidade de adesão à diversas proteínas da matriz extracelular (CHOY et al. 2007), bem como, às proteínas de regulação do sistema complemento, fator H (FH), FHL-1, FHR-1 e C4BP (CHOY et al. 2011; CASTIBLANCO-VALENCIA et al. 2012). A região não idêntica da proteína LigA (LigANI) já apresentou resultados promissores em experimentos de imunoproteção em modelo animal, porém, sem a promoção de uma resposta imune esterilizante (SILVA et al., 2007; COUTINHO et al., 2011; HARTWIG et al., 2014). Já com a proteína LigB ainda não existem resultados confiáveis que evidencie sua capacidade imunoprotetora (ADLER, 2015). Assim, apesar dos avanços da biotecnologia, a única estratégia de vacinação utilizada e eficaz contra a leptospirose disponível atualmente são as bacterinas (ADLER, 2015; RAJAPAKSE et. al. 2015),

demonstrando a necessidade da utilização de novas estratégias na formulação de vacinas contra essa zoonose.

Diferentes autores têm destacado a convergência no desenvolvimento de vacinas de nova geração, contra diversos patógenos, quanto a utilização de moléculas envolvidas no mecanismo de evasão do sistema complemento como antígenos vacinais (MERI; JÖRDENS; JARVA, 2008; SERRUTO et al., 2010; JONGERIUS et al., 2015). Além das proteínas LigA e LigB, já foram identificadas como ligantes dos fatores de regulação do complemento, a proteína *Leptospiral endostatin-like A* (LenA), como ligante do fator H (VERMA et al., 2006), e a proteína *Leptospiral complement-regulator acquiring protein A* (LcpA) como ligante de C4BP (BARBOSA et al., 2010). Choy (2012) relatou o possível papel de sinergia das duas proteínas citadas juntamente com as proteínas Lig na inibição das vias clássica e alternativa do complemento, permitindo a sobrevivência das leptospiros no soro, e consequentemente a colonização do hospedeiro.

Uma possível neutralização de moléculas utilizadas na evasão do sistema complemento, promovida por imunização, permitiria uma ativação mais eficiente deste sistema frente a uma infecção por leptospiros patogênicos, resultando em uma maior suscetibilidade do patógeno e uma melhor ativação da imunidade adaptativa (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; VERMA et al., 2006; MERI; JÖRDENS; JARVA, 2008; SERRUTO et al., 2010; JONGERIUS, 2015). Assim, a associação desses antígenos em uma formulação vacinal apresenta-se como uma estratégia para o desenvolvimento de uma vacina recombinante de subunidade contra a leptospirose, buscando alcançar uma capacidade imunoprotetora e imunoesterilizante. Para isso, neste trabalho foi realizada a expressão das proteínas LigBNI, LenA e LcpA de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni em sistema heterólogo.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Expressar de forma heteróloga as proteínas recombinantes rLigBNI, rLenA e rLcpA de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni para futura avaliação da capacidade de induzirem uma imunidade protetora contra leptospirose, quando combinadas.

2.2 Objetivos Específicos

- Construir *primers* para a amplificação dos genes *ligBNI*, *lenA* e *lcpA* de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, contendo sítios para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I.
- Amplificar os genes *ligBNI*, *lenA* e *lcpA* e clonar em vetor pAE.
- Expressar em *Escherichia coli* as proteínas recombinantes rLigBNI, rLenA e rLcpA.
- Realizar a purificação das proteínas recombinantes através de cromatografia de afinidade ao níquel.
- Caracterizar as proteínas recombinantes expressas através de *Western blot* com anticorpo anti-6xHIS.

3 Revisão de literatura

3.1 Leptospiras

As leptospiras são espiroquetas pertencentes à família *Leptospiraceae*, a qual inclui os gêneros *Leptospira*, *Leptonema* e *Turneriella* (LEVETT et al., 2015). O gênero *Leptospira* foi inicialmente dividido nas espécies *L. biflexa latu sensu* e *L. interrogans latu sensu* de acordo com sua patogenicidade, como descrito por Faine e Stallman (1982). Atualmente já foram descritas 22 espécies, sendo *L. alstonii*, *L. idonii*, *L. terpstrae*, *L. vanthielli*, *L. yanagawae* e *L. mayottensis* relatadas nos últimos três anos (LEVETT, 2015; SMYTHE et al.; 2013; BOURHY et al., 2014), contabilizando dez espécies patogênicas, cinco intermediárias e sete saprófitas. A classificação dos sorovares que compõem o gênero pode ser realizada através de testes sorológicos, como o teste de aglutinação cruzada (CAAT) ou, mais recentemente, deduzidos por técnicas de caracterização molecular, permitindo distinguir mais de 300 sorovares de *Leptospira* spp., agrupados em 26 sorogrupos (CERQUEIRA e PICARDEAU, 2009).

O genoma das leptospiras possui no mínimo dois replicons, CI e CII. O cromossomo circular maior (CI) possui cerca de 4,3 Mb, enquanto o segundo replicon (CII) varia de tamanho entre 278 e 350 kb, sendo também formado por genes essenciais à sobrevivência da bactéria. O genoma é caracterizado por um conteúdo G+C de 35-42%, possuindo cerca de 2000 genes conservados entre as diferentes espécies, e aproximadamente 1000 genes específicos das espécies patogênicas (DELLAGOSTIN et al., 2011).

Quanto às suas características morfológicas, as leptospiras medem cerca de 6-20 µm de comprimento e aproximadamente 0,1 µm de diâmetro, possuem forma espiralada e extremidades em forma de ganchos, além de dois flagelos localizados no espaço periplasmático que conferem movimentos de rotação e translação (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; LEVETT, 2001). As leptospiras apresentam um crescimento ótimo *in vitro* na faixa de 28 – 30°C, e em pH de 7,2 - 7,6, sendo obrigatoriamente aeróbias. Necessitam de um meio de cultura enriquecido com vitaminas, ácidos graxos de cadeia longa como fonte de carbono, e sais de amônio como fonte de nitrogênio, além de outros componentes nutricionais como: fosfatos, cálcio, magnésio e ferro. O meio de cultura mais utilizado para o cultivo de leptospiras

é o EMJH (Ellinghuasen-McCullough modificado por Johnson e Harris), baseado em ácido oleico, albumina sérica bovina e polisorbato 80, geralmente suplementado com soro de coelho ou outros suplementos comerciais (LEVETT, 2001; EVANGELISTA e COBURN, 2010; CAMERON, 2015).

As leptospirosas possuem uma estrutura de dupla membrana, na qual a membrana citoplasmática está intimamente associada à parede celular de peptidoglicano, sendo sobrepostas, após uma região periplasmática, por uma membrana externa (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004). Esta membrana externa apresenta lipopolissacarídeos (LPS), proteínas transmembranas e lipoproteínas expostas na superfície. Muitas destas lipoproteínas de membrana externa são essenciais nos mecanismos de virulência das bactérias patogênicas, e conseqüentemente no desenvolvimento da leptospirose (HAAKE e MATSUNAGA, 2010). O LPS das leptospirosas possui um baixo potencial endotóxico comparado com o de bactérias gram-negativas e as características específicas do Lipídeo A que os compõe estão diretamente relacionadas com o estímulo da resposta inata e a suscetibilidade de diferentes hospedeiros (FRAGA; BARBOSA; ISAAAC, 2011; NAHORI et al., 2005).

3.2 Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, com maior incidência nas regiões tropicais. Em países em desenvolvimento, a leptospirose está relacionada com falta de saneamento básico, atividades profissionais e superpopulação, enquanto atividades recreativas são as principais causas da doença em países desenvolvidos (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica, tornando-se epidêmica em períodos chuvosos principalmente nas capitais e áreas metropolitanas devido às enchentes associadas à aglomeração populacional de baixa renda, às condições inadequadas de saneamento e à alta infestação de roedores infectados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A infecção por leptospirosas patogênicas pode se dar de forma direta, no contato com a urina de animais portadores, ou de forma indireta através de água, solo ou outros meios contaminados, tendo como porta de entrada cortes e abrasões na pele ou membranas mucosas, tais como superfícies conjuntivas, orais ou genitais (HAAKE

e LEVETT, 2015). Roedores como os ratos e camundongos são os carreadores assintomáticos das leptospiros, enquanto centenas de espécies de mamíferos, selvagens e domésticos, já demonstraram ser hospedeiros suscetíveis, como bovinos, cães e o homem (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; ADLER, 2015).

A manifestação clínica da doença apresenta duas fases, a primeira, denominada “leptospirêmica” ou “septicêmica”, caracteriza-se pela disseminação das leptospiros no sangue, possuindo um quadro inespecífico (febre, mialgia, cefaleia, náuseas, vômitos, dor abdominal). A doença pode ser autolimitada e haver cura com o fim desta fase ou evoluir com maior gravidade na fase “leptospirúrica” ou “imune”, a qual é caracterizada pela detecção de anticorpos específicos no sangue e a excreção de leptospiros na urina (LEVETT, 2001). Nesta etapa o quadro pode demonstrar-se em sua forma mais branda ou anictérica ou evoluir para forma íctero-hemorrágica, caracterizada por complicações multissistêmicas. As formas mais graves da doença são observadas em cerca de 10-15% dos pacientes, podendo nestes casos ser desenvolvidos alguns sintomas clássicos como: icterícia, falência renal e síndrome pulmonar hemorrágica (BHARTI et al., 2003; FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2010; GOUVEIA et al., 2008), assim como, sintomas atípicos, mas já descritos, como: pancreatite, síndromes hemolíticas, encefalites e uveítes (RAJAPAKSE et al., 2015).

Em animais de produção, como bovinos e suínos, a leptospirose pode resultar em distúrbios reprodutivos como a retenção da placenta, abortos e natimortos; em alterações congênitas; ou em infecções não aparentes capazes de levá-los à subfertilidade, causando perdas produtivas e reprodutivas no animal, resultando em significativas perdas no setor agropecuário (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; HAMOND et al., 2014; ELLIS, 2015).

A administração precoce de antibióticos pode prevenir a progressão da doença para o quadro mais severo. Leptospiros são suscetíveis a beta-lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas e estreptomicinas. (FAINE et al., 1999 *apud* HAAKE e LEVETT, 2015). Casos severos da doença devem ser tratados com penicilina intravenosa, enquanto que em outros casos pode ser realizada a administração de antibióticos orais como amoxicilina, ampicilina, doxiciclina e eritromicina (BRETT-MAJOR e COLDREN, 2012). A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003), recomenda o início da antibioticoterapia preferencialmente antes do 5º dia do estabelecimento da infecção, considerando os benefícios após esse prazo

serem controversos. Porém, a dificuldade de um diagnóstico precoce e preciso atrapalha a decisão clínica para o início de um tratamento, sendo a avaliação da exposição do paciente aos fatores de risco, seu histórico, e os sintomas presentes, levados em conta para uma identificação precoce (WHO, 2003).

O diagnóstico da doença ocorre através da identificação direta da bactéria em cultura ou amostras clínicas através de métodos imunológicos, ou ainda, por métodos moleculares (PICARDEAU, 2013). A identificação direta se baseia na visualização do microrganismo a partir de amostras de urina ou sangue, através de microscopia de campo escuro, sendo muitas vezes necessária a realização de um cultivo prévio, dificultando um diagnóstico precoce visto que o crescimento das leptospirosas é fastidioso e a visualização do cultivo deve ser realizada semanalmente por até 13 semanas (HAAKE e LEVETT, 2015). O teste de aglutinação microscópica (MAT) é considerado como o diagnóstico sorológico padrão para leptospirose devido sua alta sensibilidade (>90%) e especificidade (>97%), detectando a presença de anticorpos aglutinantes presentes no soro de pacientes, específicos aos epítomos de diferentes sorovares da *Leptospira* spp. As desvantagens encontradas nesse método padrão incluem a baixa sensibilidade na fase inicial da doença, a necessidade do pareamento de amostras para a identificação da soroconversão, e a manutenção de uma bateria de cepas vivas para a triagem dos soros suspeitos. (SANTOS, 2011; GORIS e HARTSKEERL, 2014). Outros testes sorológicos utilizados envolvem ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), Ensaio de Hemaglutinação Indireta (IHA), imunofluorescência, testes imunocromatográficos, e de aglutinação em látex. (JAIN; NIGAM; MALIK, 2015). Quanto aos testes moleculares, diversas variações da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são utilizadas, tendo o PCR em tempo real, como o teste mais apropriado para um diagnóstico precoce da doença, podendo detectar baixas quantidades do micro-organismo, porém, exigindo equipamentos específicos e treinamento especializado (PICARDEAU, 2013; JAIN; NIGAM; MALIK, 2015).

A vacinação humana contra a leptospirose é realizada através de bacterinas, sendo utilizadas em poucos países como, Japão, Cuba, França e China (DELLAGOSTIN et al., 2011). Estas formulações conferem uma proteção apenas contra os sorovares que compõem a vacina. A existência de um alto número de sorovares de leptospirosas patogênicas e a variabilidade dos sorovares de acordo com a localidade dificultam a existência de uma vacina de utilização mundial. Efeitos

adversos da administração de bacterinas e a indução de uma proteção de curta duração necessitando de reforços anuais, são outros problemas enfrentados com esta abordagem vacinal (KOIZUMI e WATANABE, 2005; ADLER, DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Considerando essas limitações, diversos estudos têm focado no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a leptospirose. Estudos já relataram um certo grau de proteção contra diferentes sorovares utilizando a proteína mais abundante no proteoma da *Leptospira* spp., a LipL32, quando expressa em *Mycobacterium bovis* BCG ou quando co-administrada com a subunidade β da enterotoxina termolábel de *E. coli* (LTB) (SEIXAS et al., 2007; GRASSMANN et al., 2012). As proteínas *Leptospiral Immunoglobulin-like* (Lig) também atraem a atenção para sua utilização em formulações vacinais devido ao seu envolvimento com os mecanismos de patogênese da *Leptospira*. Ainda não foram obtidos resultados de proteção total confiáveis utilizando a proteína LigB, bem como, seus fragmentos LigBRep e LigBNI (ADLER, 2015). Já a porção não-idêntica da proteína LigA (LigANI) apresentou capacidade de proteção em modelo animal em diferentes estudos, assim como, combinações específicas de domínios desta proteína (SILVA et al., 2007; COUTINHO et al., 2011). Apesar da obtenção de uma proteção total em ambos estudos, em nenhum foi possível observar a aquisição de uma imunidade esterilizante, permitindo a colonização renal. Murray et al. (2013) avaliaram a capacidade imunoprotetora de 238 antígenos recombinantes frente ao desafio com o sorovar Hardjo, não encontrando em nenhum desses antígenos uma capacidade imunoesterilizante. Sendo este, portanto, um objetivo central a ser buscado por novas formulações vacinais.

Assim, apesar dos avanços da biotecnologia nos últimos anos permitindo elucidar diferentes fatores de virulência das leptospiros e avaliando-os como antígenos vacinais, as formulações vacinais licenciadas para uso em animais e humanos continuam sendo bacterinas, comparável às utilizadas a noventa anos atrás, demonstrando a necessidade de novas abordagens na elaboração dessas formulações (ADLER, 2015).

3.3 Mecanismos de patogênese

As leptospiros entram no hospedeiro através de mucosas ou regiões da pele que apresentem alguma lesão, como cortes ou abrasões, alcançando a circulação em poucos minutos (EVANGELISTA e COBURN, 2010). Após a entrada, leptospiros saprófitas são rapidamente eliminadas da corrente sanguínea, enquanto que as patogênicas são capazes de se multiplicar e colonizar órgãos, desencadeando uma resposta imune específica. Dois mecanismos são fundamentais para isto: a capacidade de adesão das leptospiros patogênicas a células e a proteínas da matriz extracelular; e a habilidade de evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, tais como, o sistema complemento e o sistema fagocítico (FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2011).

A adesão aos tecidos é um pré-requisito para o sucesso no estabelecimento da infecção por leptospiros. Diversas proteínas já demonstraram a capacidade de adesão a variadas linhagens celulares do hospedeiro como fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e monócitos (MERIEN; BARANTON; PTOLAT, 1997; BALLARD et al., 1986; MARTINEZ-LOPEZ, FAHEY, COBURN, 2010), além de componentes da matriz extracelular como laminina, fibronectina, colágeno e elastina (BARBOSA et al., 2006; ATZINGEN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011). Entre as proteínas com múltiplas capacidades de adesão podem ser citadas as *Leptospiral immunoglobulin-like proteins* (LigA e LigB) (CHOY et al., 2007), as *Leptospiral endostatin-like proteins* (Len) (STEVENSON et al., 2007; VERMA et al., 2006), e a lipoproteína LipL32 (HOKE et al., 2008, HAUK et al., 2008). É perceptível neste gênero a redundância nas funções de adesão por proteínas da membrana externa. Hoke et al., (2008) verificaram que leptospiros mutantes para o gene *lipL32* não apresentam sua capacidade de adesão a matriz extracelular afetada. Do mesmo modo, o nocaute do gene *ligB* mantém a virulência e a capacidade de colonização renal em ratos (CRODA et al., 2008).

A motilidade é outro reconhecido fator de virulência necessário a invasão e disseminação da espiroqueta. Estudos já demonstraram que a inativação dos genes envolvidos na estrutura ou biossíntese flagelar, *fliY* e *flaA2* atenuam a virulência das leptospiros em modelo animal, já a inativação do gene *flaA1* é capaz de diminuir a mobilidade translacional das espiroquetas, mas sem atenuação da virulência (LIAO et al., 2009; LAMBERT et al., 2012).

A patogênese da leptospirose também está relacionada com a resposta imune do hospedeiro para com os componentes de membrana, como os lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e peptidoglicanos (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004). Uma importante diferença entre carreadores não suscetíveis a leptospirose, como camundongos, e hospedeiros suscetíveis a doença, é o modo de reconhecimento do LPS da *Leptospira* pelo sistema imune inato. Estudos demonstram que o lipídeo A de *Leptospira* spp. possui algumas diferenças estruturais quando comparado com o lipídeo A de outras bactérias gram-negativas (VINH; ADLER; FAINE, 1986). Devido a estas peculiaridades estruturais, o lipídeo A de *L. interrogans* não possui a capacidade de ativar em humanos o Toll-like receptor 4 (TLR4), como ocorre normalmente com outras bactérias, ativando unicamente a via TLR2. Já em camundongos, ambos são ativados (VIRIYAKOSOL et al., 2006; CHASSIN et al., 2009). O papel desse mecanismo para o desenvolvimento da inflamação já foi destacado por diferentes autores (HUNG et al., 2005; YANG et al., 2006; CHASSIN et al., 2009). Os peptidoglicanos e as glicoproteínas das espécies patogênicas também demonstraram estar envolvidas no processo de inflamação através da indução do fatores pró-inflamatórios como o TNF- α (CINCO et al., 1996; DIAMENT et al., 2002).

Para a resistência das leptospiros no hospedeiro, se faz necessária a capacidade de evasão do sistema imune. Leptospiros patogênicas possuem a capacidade de resistir a ação do sistema imune inato, resistindo a fagocitose de macrófagos e neutrófilos através da sobrevivência nestas células e posterior indução da apoptose (MERIEN; BARANTON; PEROLAT, 1997; JIN et al., 2009). A captação de moléculas de regulação do sistema complemento, como o fator H e C4BP é outro mecanismo de evasão utilizado por leptospiros patogênicas amplamente estudado desde a constatação da resistência destas bactérias à ação bactericida do complemento em comparação às leptospiros saprófitas, realizada por Johnson e Muschel (1965) (ZUERNER, 2015).

3.4 Sistema complemento e leptospirose

O sistema complemento é um dos mais importantes componentes da resposta inata, sendo composto por aproximadamente 35 proteínas presentes no soro, fluidos corpóreos, e em membranas celulares (SERRUTO et al., 2010). Essas proteínas possuem a capacidade de reagirem entre si, promovendo uma cascata de reações e resultando na opsonização e lise da membrana de patógenos, bem como, na indução de uma resposta inflamatória auxiliar ao combate à infecção. Estão amplamente distribuídas pelos fluidos corporais em forma de zimógenos, sendo ativadas nos locais de infecção. Existem três vias distintas para a ativação do complemento na membrana dos patógenos, variando quanto as moléculas necessárias para sua iniciação, mas convergindo para as mesmas moléculas efetoras (Figura 1).

A via clássica inicia-se após a ligação da molécula C1q em complexos antígeno-anticorpos formados por IgM ou IgG na superfície do patógeno. A ligação de C1q ativa as outras moléculas do complexo C1, que por sua vez cliva as proteínas C4 e C2, gerando a molécula C4b2a, uma C3 convertase. A via das lectinas se inicia através da ligação à resíduos de manose pela “*Manose Binding Lectin*” (MBL) formando complexos com as proteínas MASP (*MBL-associated serine protease*), os quais permite à MASP-2 clivar C4 e C2, e também originar a C3 convertase. Por fim, a via alternativa pode ser iniciada pela ligação espontânea do componente do sistema complemento C3b à membrana do patógeno, interagindo com o fator B e formando a C3 convertase específica desta via, C3bBb (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Independente da via de ativação, a formação de uma C3 convertase pode ser observada em todas elas. Essa enzima ativa possui a capacidade de clivar o componente C3 nos fragmentos C3a e C3b. Enquanto C3a, juntamente com outros fragmentos da cascata, terão a função de peptídeos mediadores da inflamação, a molécula C3b promoverá a opsonização de patógenos auxiliando na fagocitose, bem como, dará seguimento a uma próxima cascata de ativação que resultará na formação de um “complexo de ataque à membrana” (MAC), gerando a lise celular de patógenos.

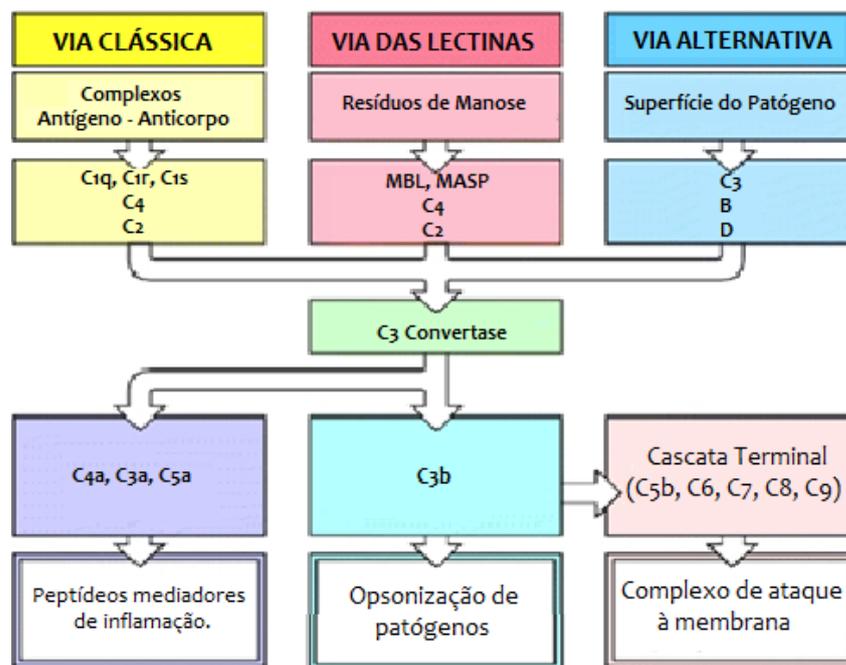


Figura 1. Esquematização das vias do sistema complemento. Todas as vias de ativação do sistema complemento levam a formação de uma C3 convertase. A formação desta molécula permite a liberação de mediadores pró-inflamatórios, a opsonização de patógenos e a formação de um complexo de ataque a membrana (Adaptado de JANEWAY et al., 2001).

Para evitar danos às células do próprio organismo e a ativação desnecessária das proteínas do complemento, o sistema conta com um preciso mecanismo de regulação. Para isso, as células expressam diferentes proteínas reguladoras atracadas às membranas, como o “*Decay accelerating factor*” (DAF) e a “*Membrane co-factor protein*” (MCP) ou ainda marcadores capazes de atrair componentes solúveis de regulação, como o Fator H (FH), responsável pela inibição da via alternativa e o C4B-binding protein (C4BP), o qual inibe as vias clássica e a da lectina. Esses reguladores aceleram o decaimento das C3 convertases, e ambos agem como co-fatores do Fator I (FI), responsável pela clivagem irreversível de C3b e C4b, interferindo desta forma nas três vias do complemento (WEILER et al., 1976; GIGLI; SROVILLO; HALBWACHS-MECARELLI, 1985; MISASI et al., 1989)

O fator H foi descrito inicialmente por Nilsson e Muller-Eberhard (1965) e refere-se a uma glicoproteína de 155 kDa composta por 20 domínios repetitivos chamados de *Short Consensus Repeats* (SCR). A porção N-terminal da proteína (SCRs 1-4) medeia as atividades regulatórias do fator, enquanto que a porção C-terminal realiza a ligação do fator à membrana celular e o reconhecimento das superfícies-alvo, podendo realizar uma atividade de inibição diretamente na superfície celular (KOPP

et al., 2012). Estudos determinaram uma concentração do Fator H no soro humano em adultos saudáveis de 265–684 µg/ml (DE PAULA et al., 2003). Existem outras proteínas que contêm domínios SCR, podendo ser formadas devido ao *splicing* alternativo do gene, como o FH-like (FHL-1), bem como, codificadas por outros genes e denominadas *Factor H related proteins* (FHR-1, FHR-2, FHR-3, FHR4a, FHR4b e FHR-5). Enquanto FHL-1 possui conservado os SCRs 1-4 e conseqüentemente a atividade reguladora, FHRs não possuem esse fragmento conservado, não tendo suas propriedades funcionais totalmente definidas, mas demonstrando recentemente capacidade de atuar na inibição de C5 e conseqüentemente da formação do complexo de ataque a membrana (HEINEN et al., 2009).

A molécula C4b *Binding protein* (C4BP) é uma glicoproteína de 570 kDa, formada por sete cadeias α idênticas, contendo oito domínios SCR cada e aproximadamente 60 aminoácidos, e uma cadeia β com três domínios SCR. Esta proteína acelera o decaimento da C3 convertase das vias clássica e das lectinas, o C4b2a e também atua como cofator de FI.

Diferentes estratégias de evasão do sistema complemento foram desenvolvidas por microrganismos patogênicos, como a produção de uma capsula para prevenção do reconhecimento pelo sistema complemento, a secreção de proteínas capazes de inativar moléculas do sistema e a capacidade de captação dos fatores de regulação (LAMBRIS; RICKLIN; GEISBRECHT, 2008). Como exemplo de proteínas microbianas identificadas com a função de ligação à fatores de regulação do complemento, podem ser citadas as proteínas: fHbp de *N. meningitidis* (PIZZA; DONNELLY; RAPPUOLI, 2008), OspE e CspA de *Borrelia burgdorferi* (HELLWAGE et al., 2001; KRAICZY et al., 2004), Sbi de *Staphylococcus aureus* (HAUPT et al., 2008) e PspC de *Streptococcus pneumoniae* (JANULCZYK et al., 2000), todas promovendo a captação do fator H; e as proteínas FHA de *Bordetella pertussis* (BERGGARD et al., 2001), PorA de *N. meningitidis* (JARVA et al., 2005) e YadA de *Yersinia enterocolitica* (KIRJAVAINEN et al., 2008), capazes de recrutar C4BP. Além destes ClfA de *S. aureus* demonstrou capacidade de ligação ao fator I (HAIR et al., 2008). As elevadas concentrações plasmáticas dos reguladores e a sua pronta disponibilidade, garantem o rápido revestimento dos patógenos ao entrarem na circulação sanguínea e conseqüentemente a sua sobrevivência no soro humano (LAMBRIS; RICKLIN; GEISBRECHT, 2008).

Assim como outros patógenos, leptospiros patogênicos possuem diferentes mecanismos que garantem a evasão do sistema complemento. A habilidade das leptospiros patogênicas em se multiplicar e se espalhar no organismo do hospedeiro reflete a baixa eficácia do complemento contra elas. Essa constatação foi realizada por Cinco e Banfi (1983) e desde então busca-se elucidar os mecanismos e fatores de virulência envolvidos nesse processo. Fraga et al. (2014) descreveram uma possível capacidade de secreção de proteases, capazes de clivar fatores do complemento por leptospiros patogênicos, porém, a captação dos fatores de regulação solúveis FH e C4BP por proteínas de membrana externa é a estratégia mais descrita. As proteínas *Leptospiral Immunoglobulin-like A* (LigA) e *Leptospiral Immunoglobulin-like B* (LigB), possuem a capacidade de adesão à ambos os fatores de regulação (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; CHOY et al., 2007). Além destes fatores, estas proteínas demonstraram recrutar FHR-1, interferindo na formação do complexo de ataque à membrana (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). Quanto a captação de C4BP, Barbosa et al. (2010) foram os primeiros a identificar a capacidade das espécies *L. interrogans*, *L. kirshneri*, *L. borgpetersnii*, e *L. noguchi* de interagir com esta molécula, identificando como responsável por essa função a proteína *Leptospiral complement factor acquiring protein A* (LcpA) (Figura 2). Atualmente as proteínas Lsa25, Lsa30 e Lsa33 também já foram relatadas como possíveis ligantes desse fator de regulação (DOMINGOS et al., 2012; SOUZA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

Quanto à captação do fator H, além das proteínas “Lig” duas proteínas da família das *Leptospiral endostatin-like* (LenA e LenB), demonstraram realizar esta função (STEVENSON et al., 2007; VERMA et al., 2010) (Figura. 2).

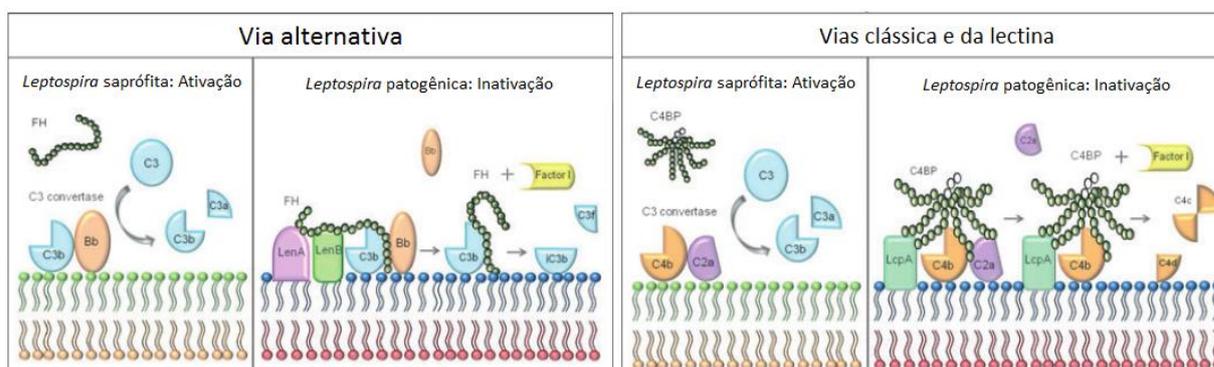


Figura 2. Representação gráfica da ação das proteínas Len e LcpA na evasão do sistema complemento. Leptospiros saprófitas são suscetíveis a ação do sistema complemento devido a ausência de proteínas com capacidade de captação de fatores de regulação do complemento (Adaptado de Fraga; Barbosa; Isaac, 2010).

Além destes fatores, a captação do plasminogênio, por bactérias patogênicas, auxilia na capacidade de degradação de C3b, promovendo a diminuição da opsonização. (BARTHEL, SCHINDLER, ZIPFEL, 2012). As proteínas de *Leptospira* spp. que já demonstraram capacidade de ligação ao plasminogênio são: LenA (VERMA et al., 2010), LipL32, rLIC12730, rLIC10494, Lp29, Lp49, Lp40, MPL36, rLIC12238 (VIEIRA et al., 2010), OmpA-like (OLIVEIRA et al., 2011), Lsa20 (MENDES et al., 2011), Lsa23, Lsa26 e Lsa36 (SIQUEIRA et al., 2013), EF-Tu (WOLFF et al., 2013), Lsa44 e Lsa45 (FERNANDES et al., 2014).

Choy (2012), demonstrou que quando expressa na espécie saprófita *L. biflexa*, a proteína LigB promove uma resistência parcial da bactéria ao soro. Essa proteção parcial demonstra o papel de outras proteínas nesta sobrevivência, indicando um possível papel de sinergismo nas funções das proteínas Lig, LenA e LcpA para esta função, como descrito pelo autor (CHOY, 2012; RAJA e NATARAJASEENIVASAN, 2013).

3.5 Leptospiral Immunoglobulin-like

As *Leptospiral Immunoglobulin-like* (Lig) compreendem os genes *ligA*, *ligB* e *ligC* e foram identificadas por Matsunaga et al. (2003) através de uma triagem em bibliotecas de expressão de *L. interrogans* e *L. kirschneri* frente ao soro humano convalescente à leptospirose. Essas proteínas pertencem a superfamília de proteínas com domínios *Bacterial Immunoglobulin-like* (BIG) repetidos, os quais incluem determinantes de virulência em outros patógenos como a intimina de *E. coli* enteropatogênica, e a adesina de *Salmonella entérica* (LUO et al. *apud* MATSUNAGA et al., 2003; BARLAG e HENSEL, 2015). Os três genes descritos estão presentes apenas em leptospirosas patogênicas. Enquanto *ligB* é altamente conservado em uma ampla variedade de espécies patogênicas, o gene *ligA* é restrito das espécies *L. interrogans*, *L. kirschneri* e *L. santarosai* e *ligC* é um pseudogene (MCBRIDE et al., 2009; CERQUEIRA et al., 2009; MURRAY, 2015).

As Lig são lipoproteínas de superfície de alto peso molecular, contendo um peptídeo sinal lipoprotéico de 17 aminoácidos seguido de uma série de 12-13 domínios Ig-Like e, no caso de LigB, de um vasto domínio carboxi-terminal. A sequência N-terminal de 630 aminoácidos da LigA e LigB são idênticas, recebendo a

denominação de porção LigBRep, enquanto que as suas porções C-terminal são variáveis, apresentando apenas 34% de identidade e sendo denominadas LigANI e LigBNI (MATSUNAGA et al., 2003).

Diversos fatores apontam as proteínas Lig como importantes fatores de virulência. A expressão destas proteínas é fortemente induzida pelo incremento da osmolaridade do meio aos níveis fisiológicos do hospedeiro, indicando um envolvimento com os estágios iniciais da infecção (MATSUNAGA et al., 2005; CHOY et al., 2007). LigA e LigB já demonstraram capacidade de ligação a diversas proteínas da matriz extracelular. LigA tem capacidade de adesão ao colágeno, laminina e fibronectina (CHOY et al., 2007; FIGUEIRA et al., 2011; LIN e CHANG, 2007), enquanto LigB além de se ligar a estes componentes é capaz de aderir a elastina, tropoelastina e heparina (LIN et al., 2009; CHING et al., 2012). Possuem também um papel no dano tecidual gerado pela infecção, através da sua capacidade de ligação ao fibrinogênio e a componentes envolvidos na cicatrização (CHOY et al., 2011). Além dos componentes da matriz, as proteínas Lig desempenham uma função importante na estratégia do patógeno de evasão do sistema complemento, através da captação dos fatores reguladores, Fator H, FHL-1, FHR-1 e C4BP (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012).

A identificação das proteínas Lig como importantes fatores de virulência e a conservação do antígeno LigB em diversas espécies de leptospiros despertou o interesse na utilização destas proteínas como antígenos vacinais. Diversos ensaios de imunoproteção em modelo animal já foram desenvolvidos até então. Koizumi e Watanabe (2004) foram os primeiros a avaliar a proteção dos antígenos LigANI e LigBNI através de um desafio homólogo em camundongos suscetíveis (C3H/HeJ). Silva et al. (2007) constataram a capacidade de proteção da porção LigANI em hamsters. As proteções encontradas neste trabalho variaram de 63% a 100% de acordo com o aumento da concentração do antígeno. Em contraste, as porções LigBRep e LigBNI não foram protetoras nesse estudo. Desde então, diversos estudos têm demonstrado a capacidade protetora tanto de vacinas de DNA utilizando os genes *ligA* e *ligB* (FAISAL et al., 2008; FORSTER et al., 2013), quanto de vacinas de subunidade utilizando os antígenos LigA e suas porções. (SILVA et al., 2007; HARTWIG et al., 2014). Foi constatado também que a imunização com os domínios 11-12 associados ao domínio 10 ou 13, da proteína LigA são suficientes para garantir

proteção frente ao desafio (COUTINHO et al., 2011; LOURDAULT et al., 2014). Quanto ao antígeno LigB, estudos já encontraram proteção na sua utilização, mas a sobrevivência de grupos controle, a variabilidade dos resultados dentro dos experimentos do próprio estudo, bem como, o contraste com o resultado de outros trabalhos, diminui a credibilidade da capacidade protetora deste antígeno (KOIZUMI e WATANABE, 2004; YAN et al., 2009; CAO et al., 2011; SILVA et al., 2007; ADLER, 2015). Embora esses antígenos tenham demonstrado capacidade de proteção, em nenhum dos casos acima citados se obteve a indução de uma resposta imune-esterilizante, sendo em todos os casos identificado a colonização renal por leptospiros, sendo este um ponto chave a ser buscado em novas formulações vacinais.

3.6 Leptospiral Endostatin-like

As proteínas *Leptospiral Endostatin-like* (Len) consistem em seis proteínas de membrana externa (LenA-F) com funções diferenciadas entre si, mas com alta similaridade à endostatina humana (STEVENSON et al., 2007). Inicialmente a proteína LenA foi identificada por Barbosa et al. (2006) e Verma et al. (2006) em dois estudos distintos. Barbosa et al. (2006) identificaram a proteína codificada pelo gene LIC12906 em *L. interrogans*, constatando sua capacidade de adesão à laminina e denominando-a Lsa24 (*Leptospiral Surface Adhesin* 24 kDa). Verma et al. (2006) buscaram em seu estudo proteínas de *L. interrogans* capazes de realizar ligação ao fator H, identificando uma proteína de membrana externa de aproximadamente 25 kDa e a denominando LfhA (*Leptospiral factor H-binding protein A*). Stevenson et al. (2007) demonstraram por fim, que ambos estudos se referiam à mesma proteína, a qual ainda possuía outras 5 proteínas homólogas em *L. interrogans*, unificando suas nomenclaturas para *Leptospiral endostatin-like proteins A-F*.

Todas as proteínas Len demonstraram capacidade de ligação à fibronectina e a laminina, enquanto LenA demonstrou também capacidade de ligação às moléculas de regulação do complemento, plasminogênio, fator H e FHR-1 e LenB às duas últimas (BARBOSA et al., 2006; STEVENSON et al., 2007; VERMA et al., 2006).

LenA demonstrou ainda ser conservada nas patogênicas *L. interrogans* sorovar Lai, Copenhageni, Grippotyphosa e Hardjo em contraste à espécie não patogênica *L.*

biflexa, sendo altamente antigênica e reconhecida por soros convalescentes humanos e equinos (VERMA et al., 2006; TOOT, 2007). Não foram encontrados trabalhos publicados avaliando a capacidade imunoprotetora dessa proteína.

3.7 Leptospiral complement regulator acquiring protein A

A primeira identificação de uma proteína capaz de se ligar ao fator de regulação do complemento C4BP foi realizada por Barbosa et al. (2010), denominando-a *Leptospiral complement regulator-acquiring protein A* (LcpA). Esta proteína demonstrou ser de membrana externa, possuir cerca de 20 kDa e estar presente nas espécies patogênicas *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchi* e *L. borgpeterseni*, e ausente na espécie saprófita *L. biflexa*. Foi observado também, que esta proteína codificada pelo gene LIC11947 se refere a mesma já descrita anteriormente como LipL22, a qual demonstrou antigenicidade ao ser reconhecida por soro humano convalescente (GAMBERINI et al., 2005).

Felix (2009) avaliou a capacidade imunoprotetora da proteína, não observando proteção contra desafio homólogo em hamsters. Fraga (2009) realizou uma imunização, neste mesmo modelo animal, com um *pool* contendo as proteínas LipL22, LipL23, LipL32, OmpA76, AnkB, Sph4 e SphH, observando a indução de anticorpos específicos as quatro primeiras proteínas e uma proteção de 30% em desafio letal homólogo.

3.8 Outras proteínas

Recentemente outras proteínas foram identificadas com a capacidade de adesão aos fatores de regulação do complemento. Domingos et al. (2012) descreveram o papel de duas proteínas de *L. interrogans* nas interações patógeno-hospedeiro, Lsa25 e Lsa33 (*Leptospiral surface adhesin*). Ambas proteínas, além da adesão em alguns fatores da matriz extracelular, demonstraram capacidade de ligação à molécula C4BP, sendo que Lsa33 ainda é capaz de se ligar ao plasminogênio. O autor ainda constatou que a sequência gênica codificante para estas proteínas é conservada nas espécies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirshneri* e *L.*

noguchi, e no caso de Lsa25 ainda em *L. santarosai*. Quando testadas em ELISA com soros humanos de fase aguda e convalescente, a proteína Lsa33 se mostrou não reativa em ambas as fases, enquanto que Lsa25 demonstrou reação com soros tanto da fase aguda quanto convalescente, demonstrando-se como um forte candidato para um diagnóstico precoce da doença (DOMINGOS et al., 2012). Souza et al. (2012), identificaram essa capacidade de ligação ao C4BP e plasminogênio também na adesina Lsa30 de *L. interrogans*. Esta proteína também demonstrou capacidade de adesão à laminina e à fibronectina. Já Siqueira et al. (2013), identificou a proteína Lsa23 como ligante dos fatores C4BP e FH, sendo neste último observada uma capacidade de adesão significativa, mas em uma baixa escala.

Domingos (2014), avaliou a capacidade imunoprotetora das proteínas Lsa25 e Lsa33. Seus resultados demonstraram que a proteína Lsa25 conferiu proteção de 20% e 30% frente aos dois ensaios de desafio homólogo em hamster. Porém, o grupo controle apresentou 20% de sobrevivência, não se observando uma proteção significativa. Do mesmo modo, a proteção de 41,5% observada em um dos dois ensaios pela proteína Lsa33 é contrastada pela sobrevivência de 25% do grupo controle.

O fator de enlogação Tu (EF-Tu) é outra molécula que recentemente demonstrou estar relacionada com a evasão do sistema imune em leptospiros patogênicas. Essa proteína bacteriana possui a capacidade de exercer mais de uma função celular, localizando-se em diferentes compartimentos. O EF-Tu de *Leptospira* spp. demonstrou estar localizado na superfície da bactéria e ter a capacidade de ligação ao plasminogênio e ao Fator H, sendo conservado em diferentes espécies do gênero (WOLFF et al., 2013). Esta proteína se demonstrou imunogênica e foi capaz de conferir 40% de proteção após dois ensaios de desafio em hamsters.

4 Metodologia

4.1 Cepas, condições de cultivo e extração do DNA

O genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi utilizado como molde para as amplificações. As leptospiros foram crescidas em meio EMJH (Difco) enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco) a 30 °C por 7 dias. Foram utilizadas 10⁸ células para a extração de DNA genômico, através do *kit* comercial *illustra bacteria genomic prep mini spin* (GE Healthcare).

Para a clonagem no vetor pAE e expressão das proteínas recombinantes, foram utilizadas as cepas *E. coli* DH5α e *E. coli* BL21 (DE3) Star, respectivamente. Estas cepas foram cultivadas a 37 °C em meio Luria-Bertani (LB) (1% triptona, 0,5% extrato de levedura e 0,5% NaCl) ou 2YT (1,6% triptona, 1% extrato de levedura e 0,5% NaCl), sendo agitados a 200 rpm ou ainda acrescidos de 1,5% de ágar. Quando necessário o meio foi suplementado com 100 µg.ml⁻¹ de ampicilina.

4.2 Desenho dos primers e amplificação dos genes por PCR

Para amplificação dos genes de interesse foram desenhados *primers* a partir de sequências depositadas no GenBank (NCBI) com o auxílio do *software* VectorNTI11 (Invitrogen), sendo colocados nos *primers forwards* sítios para a enzima de restrição *Bam*HI, e nos *primers reversos* sítios para a enzima *Kpn*I (sublinhados na tabela) visando a clonagem dos genes *ligBNI*, *lenA* e *lcpA* no vetor pAE (Tabela 1).

Tabela 1. Primers utilizados para a amplificação por PCR dos fragmentos *ligBNI*, *lenA* e *lcpA*.

Nome	Sequência 5' – 3'
<i>ligBNI_For</i>	CGGGGATCCGATGCTAGCGATATTGCTGAAATTA
<i>ligBNI_Rev</i>	CGGGGTACCTTACCTAGGACTGCCGCCACCGCCAGATACTGAACCGTAGGTCCG
<i>lenA_For</i>	CGGGGATCCATCGCTAGCGGGGATAAAAAAGAA
<i>lenA_Rev</i>	CGGGGTACCTTACCTAGGACTGCCGCCACCGCCCTGTTCTACACAGAG
<i>lcpA_For</i>	CGCGGATCCATCGCTAGCTGTGCTCCTTCGAGGT
<i>lcpA_Rev</i>	CGGGGTACCTTACCTAGGACTGCCGCCACCGCCTTTTTCTGGAGGAAGAAC

Os *primers* foram dissolvidos para uma concentração de estoque de 50 pmol/ μ l. Para as alíquotas de trabalho, 10 μ l da solução estoque foram diluídos em 30 μ l de água ultrapura livre de DNase e RNase, estabelecendo uma concentração de trabalho de 12,5 pmol/ μ l.

As sequências codificadoras dos genes foram amplificadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando a enzima Taq DNA Polimerase (*GoTaq Colores Master Mix* – Promega). Foram construídas reações com um volume final de 25 μ l contendo: 1 μ l de DNA molde, 1 μ l de *primer forward* e 1 μ l de *primer reverse*, além de 12,5 μ l de PCR Master mix (Promega) e 9,5 μ l de água. As amostras foram expostas por 5 min a 94 °C seguido de 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 s), anelamento (51 °C por 30 s) e renaturação (72 °C por 90 s), e uma última etapa de 5 min a 72 °C. Os produtos da PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose (1,5%) e purificados utilizando o *GFX PCR and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare).

4.3 Clonagem dos genes em vetor pAE

Os produtos da PCR e o vetor de expressão pAE foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*l (Invitrogen) por 2 h a 37 °C. O resultado dessas reações foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1%. O produto de cada digestão foi purificado através do mesmo *kit* anteriormente citado. Uma nova eletroforese foi realizada afim de visualizar e quantificar o material purificado. A ligação dos insertos ao vetor pAE foi realizada com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) a 4 °C *overnight*, estabelecendo uma proporção molar 3:1 de inserto/vetor.

4.4 Transformação de *E. coli* por eletroporação

Para o processo de transformação foram utilizados 80 μ l de células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α e 2 μ l dos produtos de ligação. A eletroporação ocorreu sob as seguintes condições: 25 μ F de capacitância, 200 Ω de resistência e 2.5 kV de tensão. Após a transformação as células foram plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido suplementado com 100 μ g.ml⁻¹ de ampicilina e as placas incubadas a 37 °C por 16-18 h.

4.5 Triagem dos clones recombinantes

Colônias isoladas que cresceram no meio com o antibiótico foram selecionadas e submetidas ao processo de triagem por extração rápida de DNA por fenol-clorofórmio (JOUGLARD et al., 2002). Os clones caracterizados como possíveis recombinantes através de eletroforese foram cultivados em meio LB acrescido de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ampicilina. Desse cultivo realizou-se uma extração de DNA plasmidial com *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (GE Healthcare).

Os plasmídeos extraídos foram submetidos à digestão com as mesmas enzimas de restrição (*Bam*HI e *Kpn*l) para confirmação da presença do inserto conforme descrito anteriormente. A liberação do inserto foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.6 Expressão heteróloga das proteínas rLigBNI, rLenA e rLcpA

Para expressão das proteínas recombinantes a cepa *E. coli* BL21 (DE3) Star foi transformada com os vetores pAE/LigBNI, pAE/LenA e pAE/LcpA através do processo de choque térmico. Para isso, foram adicionados em um microtubo, 100 μl de CaCl_2 (100 mM), aproximadamente 50 ng do vetor recombinante e 1 colônia fresca da cepa de expressão, mantendo-o em gelo por 15 minutos; a 42 °C por 1 minuto e novamente ao gelo por 2 minutos. O produto desse processo foi utilizado para inocular 50 ml de 2YT suplementado com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ampicilina, o qual foi cultivado a 37 °C *overnight*. Este cultivo serviu de inóculo para 450 ml de 2YT com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ampicilina, que foi incubado a 37 °C até a fase log de crescimento (DO_{600} entre 0,6 e 0,8). A expressão das proteínas recombinantes foi induzida com 1 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) por 3 h. Logo após, a cultura foi fracionada centrifugada a 10.000 *g* por 10 min a 4 °C, e os pellets utilizados para a extração proteica.

4.7 Solubilização e Purificação das proteínas recombinantes

Os pellets foram ressuspensos em 30 ml de tampão contendo 100mM de Tris-base e 300 mM de NaCl (pH 8,0) e as células rompidas por sonicação em 6 pulsos de 60 MHz por 30 segundos. A suspensão foi novamente centrifugada (10.000 x g por 10min), sendo o sobrenadante armazenado e o pellet solubilizado em tampão Tris-NaCl contendo 8 M de uréia seguido do mesmo procedimento de centrifugação. Para determinação da solubilidade das proteínas e sucesso da expressão foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e um Dot-Blot utilizando 10 µl dos sobrenadantes e os anticorpos anti-6xHIS (Sigma) (1:6000) e anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:6000).

As solubilizações contendo as proteínas recombinantes foram filtradas e purificadas através de cromatografia de afinidade em coluna de Níquel-Sepharose (GE HealthCare). As alíquotas das purificações foram submetidas a SDS-PAGE 12% e posteriormente dialisadas a 4 °C contra tampão contendo 100 mM de Tris-Base, 300 mM de NaCl e em concentrações decrescentes de ureia. Por fim, as proteínas foram dialisadas contra tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,2) *overnight* a 4 °C e armazenada a – 20 °C. As proteínas foram quantificadas pelo *kit BCA Protein Assay* (PIERCE).

4.8 Caracterização das proteínas por *Western Blot*

A caracterização das proteínas recombinantes foi realizada através de SDS-PAGE 12% seguido de *Western blot* (WB) com anticorpo monoclonal anti-6xHIS (Sigma). Membranas de nitrocelulose *Hybond ECL* (Amersham Biosciences) foram utilizadas para a eletrotransferência. As membranas foram bloqueadas com leite em pó 5%, *overnight* a 4 °C, e posteriormente lavadas 3 vezes com PBS + 0,05% de Tween 20 (PBS-T). As membranas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo anti-6xHIS em uma diluição de 1:6000. Após novas lavagens, utilizou-se como anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição de 1:6000 incubado nas mesmas condições da etapa anterior. Na última etapa foram realizadas 5 lavagens com PBS-T e a revelação com solução contendo diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂.

5 Resultados

5.1 Amplificação dos genes por PCR

Todos os genes foram corretamente amplificados por PCR, resultando em fragmentos nos tamanhos esperados de 684 pb para *lenA*, 555 pb para *lcpA* e 1500 pb para *ligBNI* respectivamente (Figura 3).

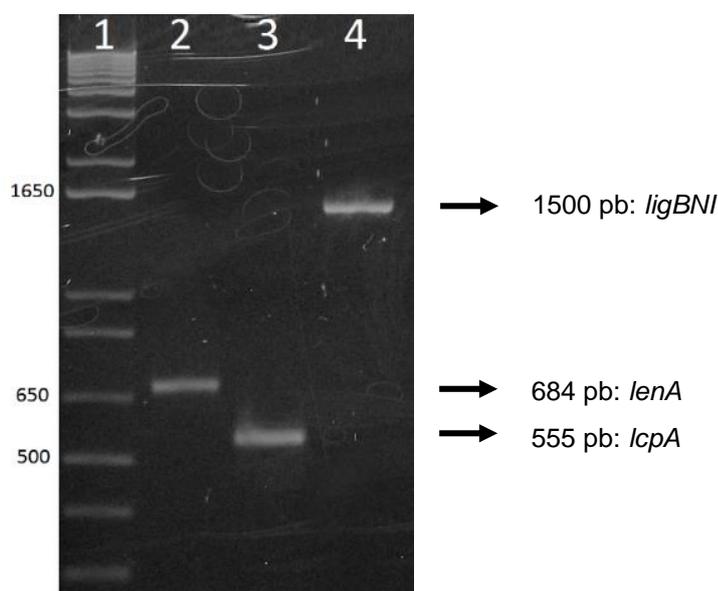


Figura 3. Amplificação por PCR dos genes *lenA*, *lcpA* e *ligBNI*. (1) Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); (2) amplificação do gene *lenA*; (3) amplificação do gene *lcpA*; (4) amplificação do gene *ligBNI*.

Após a digestão dos insertos e do vetor pAE com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I, os insertos foram clonados em seus vetores, gerando as construções recombinantes *pAE/lenA*, *pAE/lcpA* e *pAE/ligBNI*.

5.2 Caracterização dos clones recombinantes

Após a transformação em *E. coli* DH5 α foi possível a identificação da presença dos clones recombinantes em colônias resistentes à ampicilina. Foi realizada uma triagem inicial através da visualização em gel de agarose em busca de um padrão de banda mais alta do que a do vetor sem inserto, sugerindo a presença dos genes de interesse nessas construções. As colônias selecionadas, tiveram seus plasmídeos

propagados, extraídos e digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I, permitindo obter ao menos um plasmídeo recombinante caracterizado para cada gene de interesse (Figura 4).

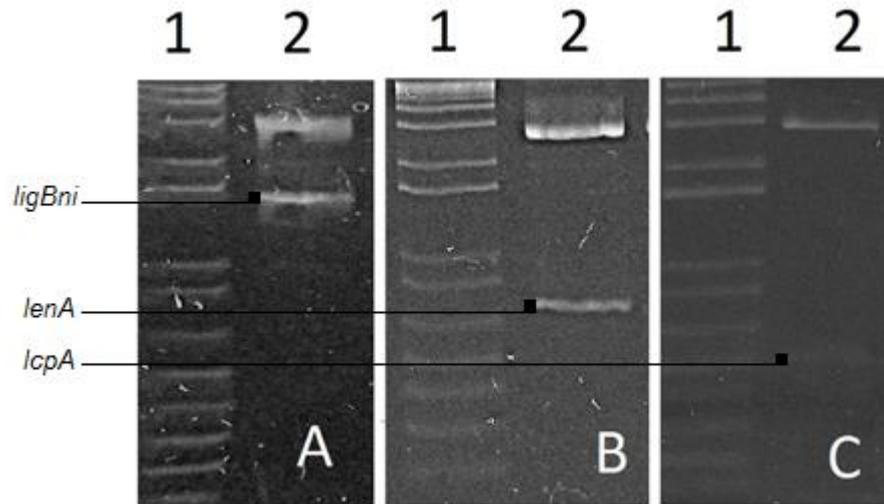


Figura 4. Caracterização dos vetores recombinantes através da digestão com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I. Vetores recombinante pAE/*ligBni* (A); pAE/*lenA* (B) e pAE/*lcpA* (C). (1) Marcadores de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); (2) clones recombinantes.

5.3 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Os plasmídeos que tiveram a presença do inserto confirmada, foram utilizados para transformação em *E. coli* BL21 (DE3) Star. Todas as proteínas foram expressas na forma insolúvel, sendo o protocolo de solubilização em ureia eficiente. A purificação permitiu obter corretamente uma banda única, aparentemente livre de contaminantes, para cada proteína recombinante, apresentando os tamanhos esperados de 52 kDa para rLigBni, 25 kDa para rLenA e 22 kDa para rLcpA (Figura 5).

Os rendimentos obtidos pelas expressões de acordo com a quantificação pelo kit *BCA protein Assay* (PIERCE) após as etapas de purificação e diálise foram de 28,71 mg/L de cultivo para rLigBni, 4,97 mg/L para rLenA e 2,28 mg/L para rLcpA.

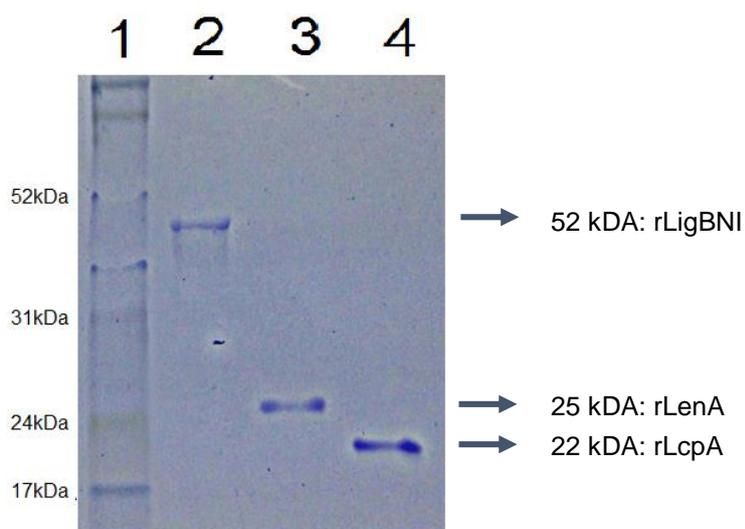


Figura 5. SDS-PAGE das proteínas recombinantes purificadas. (1) Marcador de massa molecular *Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker* (GE Healthcare); (2) rLigBni; (3) rLenA; (4) rLcpA.

5.4 Caracterização das proteínas recombinantes por *Western blot*

Todas as proteínas recombinantes foram reconhecidas pelo anticorpo monoclonal (mAB) anti-6xHIS nos tamanhos esperados, através da técnica de *Western blot* (Figura 6). Como controle negativo foi utilizado extrato de *E. coli* não transformada, não apresentando nenhum reconhecimento no ensaio.

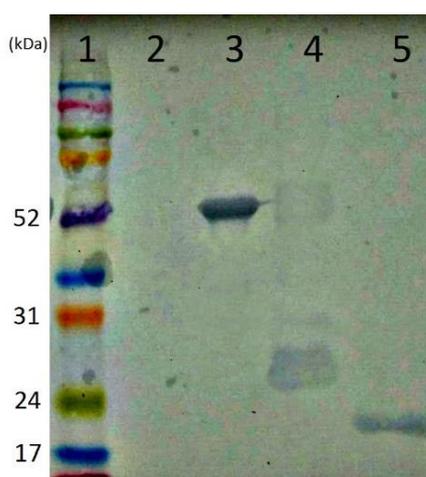


Figura 6. Caracterização das proteínas recombinantes através de *Western blot*: (1) Marcador de massa molecular *Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker* (GE Healthcare); (2) *E. coli* não transformada; (3) rLigBni (52kDa); (4) rLenA (25kDa); (5) rLcpA (22 kDa)

6 Discussão

O desenvolvimento de novas formulações vacinais contra a leptospirose, com capacidade imunoprotetora e imuno-esterilizante permanece um desafio. A utilização de proteínas de membrana externa relacionadas com a capacidade de evasão do sistema complemento demonstra ser uma estratégia interessante e utilizada para a imunização contra diferentes patógenos (MADICO et al., 2006; SANTI et al., 2009; SANTOLAYA et al., 2012; SCHACHERN et al., 2014). A habilidade de evadir do sistema complemento do hospedeiro, confere uma ampla vantagem ao patógeno para sua disseminação e colonização como descrito por diversos autores em relação às leptospirosas patogênicas (MERI et al., 2005; BARBOSA et al., 2008; CINCO, 2010; FRAGA et al., 2011; CHOY, 2012).

Estudos anteriores já identificaram diversas proteínas de *Leptospira* spp. com a capacidade de captação de fatores de regulação do sistema complemento. As proteínas *Leptospiral immunoglobulin-like* foram identificadas quanto sua capacidade de adesão a esses fatores por Castiblanco-Valência et al. (2012), sendo antígenos promissores no desenvolvimento de novas composições vacinais devido aos diversos relatos de proteção obtidos em imunizações utilizando estes fragmentos (KOIZUMI e WATANABE, 2004; SILVA et al., 2007; YAN et al., 2009; FAISAL et al., 2009; COUTINHO et al., 2011; FORSTER et al., 2013; LOURDAULT et al., 2014). Porém, muitas limitações ainda são apresentadas em ensaios de desafio em modelo animal utilizando esses antígenos. O antígeno LigANI apesar de conferir proteção total em diferentes ensaios, ainda não se demonstrou capaz de conferir uma imunidade esterilizante, assim como os fragmentos LigBRep e LigBNI. Quanto a estes últimos, sua capacidade imunoprotetora ainda é controversa, devido a sobrevivência de grupos controle em ensaios com proteção e dificuldade na reprodutibilidade dos resultados (KOIZUMI e WATANABE, 2004; YAN et al.; 2009; CAO et al., 2011).

Choy (2012) avaliou a influência da proteína LigB para a sobrevivência das leptospirosas em soro humano. Essa sobrevivência é exclusiva das espécies patogênicas, visto que as saprófitas são rapidamente eliminadas após entrarem na corrente sanguínea, permitindo evidenciar o papel de fatores de virulência existentes com exclusividade em espécies patogênicas. Porém, foi observado que quando expressa na cepa saprófita *L. biflexa*, a proteína LigB promove uma maior sobrevivência

ao patógeno, mas não confere uma proteção total frente ao soro, evidenciando a utilização de outras proteínas relacionadas com a evasão do sistema imune, em espécies patogênicas, para a sua sobrevivência. Sendo destacadas pelo autor as proteínas LenA e LcpA como as possíveis atuantes neste papel de sinergia com a proteína LigB, quanto a esta função (CHOY, 2012; RAJA e NATARAJASEENIVASAN, 2013).

Estas evidências permitiram a construção da hipótese que sustenta a necessidade deste trabalho. A promoção de uma resposta humoral específica capaz de realizar uma possível neutralização de moléculas de evasão do sistema complemento permitirá uma atuação mais eficiente deste sistema frente a uma infecção por leptospiros patogênicas, resultando em uma maior suscetibilidade do patógeno e uma melhor ativação da imunidade adaptativa. Para testar essa hipótese este trabalho realizou a expressão dos antígenos LigBNI, LenA e LcpA que juntamente com o antígeno LigANI já expresso anteriormente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Vacinologia (CDTec-UFPEl) permite a avaliação da capacidade dessas proteínas, quando combinadas, de promoverem a suscetibilidade do patógeno ao sistema complemento, e/ou promoverem uma resposta imuno-protetora contra a leptospirose.

Neste estudo foi possível obter com êxito as proteínas recombinantes através de um sistema de expressão heteróloga, utilizando a cepa *E. coli* BL21 (DE3) Star e o vetor de expressão pAE. A correta amplificação, digestão e clonagem dos fragmentos gênicos demonstraram o sucesso na construção *in silico* dos *primers*. O sistema de expressão em *E. coli*, utilizado aqui, é o sistema bacteriano mais utilizado para a expressão de proteínas recombinantes em laboratórios de pesquisa (CHEN, 2012). A cepa de expressão utilizada difere das cepas relatadas por alguns outros artigos para a expressão das proteínas LenA e LcpA (VERMA et al., 2006; BARBOSA et al., 2010). A cepa de expressão Star, utilizada neste trabalho, confere uma maior estabilidade ao mRNA, através de uma mutação em um gene codificante para uma RNase, garantindo níveis de expressão 2-10 vezes maior do que a cepa selvagem (INVITROGEN, 2003).

Quanto ao vetor utilizado, este possui a capacidade de adição de “cauda” de seis resíduos de histidina à proteína de interesse, o que permitiu realizar com sucesso a purificação das proteínas por cromatografia de afinidade, não se evidenciando possíveis contaminantes nas amostras. Uma importante vantagem de proteínas de

fusão com cauda de histidina em relação a outras como as fusionadas a glutathione-S-transferase (GST) ou à cauda FLAG®, é a possibilidade de purificação em condições desnaturantes, visto que as interações entre os resíduos de histidina e a coluna sensibilizada com níquel é estável em concentrações altas de ureia (8 M), como as utilizadas neste estudo (RAMOS et al., 2004). Após a purificação se fez necessário o processo de remoção do agente desnaturante e do imidazol por diálise, no qual também foi observado o sucesso no procedimento adotado. Os resíduos de histidina também permitiram a caracterização das proteínas por *Western Blot* utilizando mAB anti-6xHIS.

Neste trabalho, as sequências codificantes dos genes *ligBNI*, *lenA* e *lcpA* foram clonadas em vetor pAE, obtendo-se vetores recombinantes funcionais. A utilização destes vetores permitiu obter proteínas recombinantes que possibilitam a realização de ensaios futuros que busquem avaliar a capacidade da indução de uma resposta imunoprotetora através da combinação destes antígenos. Além das proteínas expressas neste estudo, outras proteínas tiveram sua capacidade de ligação aos fatores de regulação identificada nos últimos anos. Essas proteínas se demonstram como alvos para a utilização na mesma estratégia aqui descrita.

7 Perspectivas Futuras

A expressão das proteínas rLigBNI, rLenA e rLcpA, juntamente com a do antígeno rLigANI já produzida por nosso grupo de pesquisa, permitirá o desenvolvimento de ensaios para a avaliação da capacidade imunoprotetora, da combinação destes antígenos, contra leptospirose.

Será possível verificar a capacidade imunogênica das proteínas, assim como, se os anticorpos produzidos por estas possuem a capacidade de reduzir ou neutralizar a captação dos fatores de regulação do complemento por leptospirosas patogênicas, através da avaliação da suscetibilidade da bactéria ao soro hiperimune.

Além disto, será possível a construção de formulações vacinais para utilização frente a um desafio homólogo com *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1-130, em modelo animal *Mesocricetus auratus* (Hamster Dourado). Serão construídos *pools* contendo as proteínas LenA e LcpA, juntamente com uma das proteínas Lig (LigANI ou LigBNI).

8 Conclusão

- A construção *in silico* dos *primers* para a amplificação dos genes de interesse foi realizada com sucesso, permitindo a amplificação correta dos fragmentos por PCR.

- Os processos de digestão e ligação dos fragmentos em vetor pAE utilizados permitiram a obtenção dos vetores funcionais *pAE/ligBNI*, *pAE/lenA* e *pAE/lcpA*.

- A expressão das proteínas recombinantes rLigBNI, rLenA e rLcpA em sistema de expressão procarioto utilizando a cepa *E. coli* BL21 (DE3) Star foi eficiente.

- O processo de purificação através de cromatografia de afinidade ao níquel permitiu a obtenção das proteínas de interesse aparentemente livres de contaminantes.

- Ensaio futuros serão realizados com o objetivo de avaliar a capacidade destas proteínas, quando combinadas, de promoverem a suscetibilidade do patógeno ao sistema complemento e/ou induzirem uma resposta imune protetora contra a leptospirose.

Referências

- ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. Berlin: Springer, 2015. 295 p.
- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.287–296, 2010.
- ATZINGEN, M. V.; BARBOSA, A. S.; DE BRITO, T.; VASCONCELLOS, S. DE MORAIS, Z. M.; LIMA, D. M. C.; ABREU, P. A. E.; NASCIMENTO, A. L. T. O., Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC microbiology**, v.8, p.70, 2008.
- BALLARD, S. A.; WILLIAMSON, M.; ADLER, B.; VIHN, T.; FAINE, S. Interactions of virulent and avirulent leptospires with primary cultures of renal epithelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, v.21, n.1, p.59–67, 1986.
- BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A. E.; NEVES, F. O.; ATZINGEN, M. V.; WATANABE, M. M.; VIEIRA, L. M.; MORAIS, Z.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. A Newly Identified Leptospiral Adhesin Mediates Attachment to Laminin. **Infection and Immunity**, v.74, n.11, p.6356–6364, 2006.
- BARBOSA, A. S.; MONARIS, D.; SILVA, L. B.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CIANCIARULLO, M. A.; ISAAC, L.; ABREU, P. A. E. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v.78, n.7, p.3207–3216, 2010.
- BARLAG, B.; HENSEL, M. The Giant Adhesin SiiE of *Salmonella enterica*. **Molecules**, v.20, p.1134–1150, 2015.
- BARTHEL, D.; SCHINDLER, S.; ZIPFEL, P. F. Plasminogen is a complement inhibitor. **The Journal of biological chemistry**, v.287, n.22, p.18831–18842, 2012.
- BERGGÅRD, K.; LINDALH, G.; DAHLBACK, B.; BLOM, A. M. Bordetella pertussis binds to human C4b-binding protein (C4BP) at a site similar to that used by the natural ligand C4b. **European journal of immunology**, v.31, n.9, p.2771–2780, 2001.

BHARTI, A. R.; NALLY, J.; RICARDI, J.; MATTHIAS, M.; DIAZ, M.; LOVETT, M.; LEVETT, P.; GILMAN, R.; WILLING, M.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v.3, n.12, p.757–771, 2003.

BOURHY, P.; COLLET, L.; BRISSE, S.; PICARDEAU. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, n.1, p.4061–4067, 2014.

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

CAMERON, C. E. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. In: Adler, B. **Leptospira and Leptospirosis**, Berlin: Springer, 2015. p.21-41.

CAO, Y.; FAISAL, S.; YAN, W.; CHANG, Y.; MCDONOUGH, S.; CHANG, N.; AKEY, B. L.; CHANG, Y. Evaluation of novel fusion proteins derived from extracellular matrix binding domains of LigB as vaccine candidates against leptospirosis in a hamster model. **Vaccine**, v.29, n.43, p.7379–7386, 2011.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; FRAGA, T. R.; SILVA, L. B.; MONARIS, D.; ABREU, P. A.; STROBEL, S.; JOZSI, M.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **Journal of Infectious Diseases**, v.205, n.6, p. 995–1004, 2012.

CERQUEIRA, G. M.; MCBRIDE, A. J. A.; PICARDEAU, M.; RIBEIRO, S. G.; MOREIRA, A. N.; MOREL, V.; REIS, M. G.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A. Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of ligB to typing leptospiral isolates. **Journal of medical microbiology**, v.58, n. 9, p.1173–81, 2009.

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v.9, n.5, p.760–8, 2009.

CHASSIN, C.; PICARDEAU, M.; GOUJON, J.; BOURHY, P.; QUELLARD, N., DARCHE, S.; BADELL, E.; D'ANDON, M. F.; WINTER, N.; LACROIX-LAMANDE, S.; BUZONI-GATEL, D.; VANDEWALLE, A.; WERTS, C. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. **Journal of immunology**, v.183, n.4, p.2669–77, 2009.

CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. **Biotechnology Advances**, v.30, n.5, p. 1102–1107, 2012.

CHING, A. T. C.; FAVARO, R. D.; LIMA, S. S.; CHAVES, A. A. M.; DE LIMA, M. A.; NADER, H. B.; ABREU, P. A. E.; HO, P. L. Leptospira interrogans shotgun phage display identified LigB as a heparin-binding protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v.427, n.4, p.774–779, 2012.

CHOY, H. A. KELLEY, M. M.; CHEN, T. L.; MOLLER, A. K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Physiological osmotic induction of Leptospira interrogans adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, v.75, n.5, p. 2441–2450, 2007.

CHOY, H. A. Multiple activities of ligb potentiate virulence of Leptospira interrogans: Inhibition of alternative and classical pathways of complement. **PLoS ONE**, v.7, n.7, 2012.

CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CRODA, J.; MATSUNAGA, J.; BABBITT, J. T.; KO, A. I.; PICARDEAU, M.; HAAKE, D. A. The multifunctional LigB adhesin binds homeostatic proteins with potential roles in cutaneous infection by pathogenic Leptospira interrogans. **PloS one**, v.6, n.2, 2011.

CINCO, M.; BANFI, E. Activation of complemente by leptospire and its bactericidal activity. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, v.254, n.2 p.147-289, 1983.

CINCO, M.; VECILE, E.; MURGIA, R.; DOBRINA, P. Leptospira interrogans and Leptospira peptidoglycans induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes. **FEMS microbiology letters**, v.138, n.2-3, p.211–214, 1996.

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

COSTA, F; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TOGERSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M. S.; STEIN, C.; ABELA-RIDDER, B.; KO, A. I. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.3, p.1–19, 2015.

COUTINHO, M.; CHOY, H.; KELLEY, M.; MATSUNAGA, J.; BABBITT, J.; LEWIS, M.; ALEIXO, J.A.; HAAKE, D. A LigA Three-Domain Region Protects Hamsters from Lethal Infection by *Leptospira interrogans*. **Neglected Tropical Diseases**, v.12, n.5, 2011

CRODA, J.; FIGUEIRA, C. P.; WUNDER JR., E. A.; SANTOS, C. S.; REIS, M. G.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: Disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infection and Immunity**, v.76, n.12, p.5826–5833, 2008.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiol Rev**, v.28, n.3, p.291-318, 2004.

DE PAULA, P. F.; BARBOSA, J. E.; JUNIOR, P. R.; FERRIANI, V. P. L.; LATORRE, M. R. D. O.; NUDELMAN, V.; ISAAC, L. Ontogeny of Complement Regulatory Proteins - Concentrations of Factor H, Factor I, C4b-Binding Protein, Properdin and Vitronectin in Healthy Children of Different Ages and in Adults. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.58, p.572–577, 2003.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMAN, A. A.; HARTWIG, D.; FÉLIX, S.; SILVA, É. F.; MCBRIDE, A. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines**, v.11, n.7, p.1215-1224, 2011.

DIAMENT, D.; BRUNIALTI, M.; ROMERO, E. C.; KALLAS, E. G.; SALOMAO, R. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. **Infection and Immunity**, v.70, p.1677–1683, 2002.

DOMINGOS, R. F.; VIEIRA, M.; ROMERO, E. C.; GONÇALES, A. P.; MORAIS, Z.; M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. “Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions”. **BMC Microbiology**, v.12, n.1, p.50, 2012.

DOS SANTOS, A. C. **Diagnóstico sorológico da leptospirose: benefício de amostra aguda tardia na confirmação de casos**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia em saúde e medicina investigativa). Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2011.

ELLIS, W. A. Animal Leptospirosis. In: Adler, B. **Leptospira and Leptospirosis**, Berlin: Springer, 2015. p.100-138.

EVANGELISTA, K.; COBURN, J. *Leptospira* as an emergin pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiol**, v.5, n.9, p.1413–1425, 2010.

FAINE, S.; STALLMAN, N. D. Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the species *L.interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L.biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. **Int J Syst Bacteriol**. v.32, n.4, p461-463, 1982.

FAISAL, S. M.; YAN, W.; CHEN, C.; PALANIAPPAN, R.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, Y. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. *Vaccine*, v.26, p.277–287, 2008.

FELIX, S. **Evaluation of the immune protective potential of *Leptospira interrogans* recombinant antigens**. Universidade Federal de Pelotas: Pelotas, 2009. 46p.

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

FIGUEIRA, C. P.; CRODA, J.; CHOY, H. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. Heterologous expression of pathogen-specific genes *ligA* and *ligB* in the saprophyte *Leptospira biflexa* confers enhanced adhesion to cultured cells and fibronectin. **BMC microbiology**, v.11, n.1, p.129, 2011.

FORSTER, K. M. HARTWIG, D. D., SEIXAS, F. K.; BACELO, K. L.; AMARAL, M.; HARTLEBEN, C. P.; DELLAGOSTIN, O. A. A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response against leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.20, n.5, p. 725–731, 2013.

FRAGA, T. R. **Estudo de potenciais antígenos vacinais de *leptospira interrogans* sorovar *copenhageni***. USP/Insituto Butantan/IPT, São Paulo, 2009.

FRAGA, T. R.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Leptospirosis: Aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.73, p.408–419, 2011.

FRAGA, T. R.; COURROL, D. S.; CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; HIRATA, I. Y.; VASCONCELLOS, S. A.; JULIANO, L.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: The secretion of proteases that directly cleave complement proteins. **Journal of Infectious Diseases**, v.209, p.876–886, 2014.

GAMBERINI, M.; GOMES, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A. L.; VASCONCELOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**, v.244, n.2, p.305–313, 2005.

GIGLI, I.; SORVILLO, J.; HALBWACHS-MECARELLI, L.; Regulation and deregulation of the fluid-phase classical pathway C3 convertase. **J Immunol.** v.135, n.1, p.440-444, 1985.

GORIS, M. G. A; HARTSKEERL, R. A. Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. **Current Protocols in Microbiology**, n.32, p.1–18, 2014.

GOUVEIA, E. L.; METCALFE, J.; DE CARVALHO, A.; AIRES, T.; VILLASBOAS-BISNETO, J.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A.; SALGADO, K.; REIS, M.; KO, A. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.3, p.505–508, 2008.

GRASSMANN, A. A. FELIX, S. R.; DOS SANTOS, C. X.; AMARAL, M. G.; SEIXAS NETO, A. C. P.; FAGUNDES, M. Q.; SEIXAS, F. K.; SILVA, E. F.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the b subunit of escherichia coli heat-labile enterotoxin. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.19, n.5, p.740–745, 2012.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in Humans. In: Adler, B. **Leptospira and Leptospirosis**, Berlin: Springer, 2015. p.65-99.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: A spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular Microbiology**, v.77, n.4, p.805–814, 2010.

HAIR, P. S.; WARD, M. D.; SEMMES, O. J.; FOSTER, T. J.; CUNNION, K. M. Staphylococcus aureus clumping factor A binds to complement regulator factor I and increases factor I cleavage of C3b. **The Journal of infectious diseases**, v.198, n.1, p.125–133, 2008.

HAMOND, C.; PINNA, A.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. The role of leptospirosis in reproductive disorders in horses. **Tropical animal health and production**, v.46, n.1, p.1–10, 2014.

HARTWIG, D.; BACELO, K.; OLIVEIRA, P.; OLIVEIRA, T.; SEIXAS, F.; AMARAL, M.; HARLEBEN, C.; MCBRIDE, A.; DELLAGOSTIN, O.A. Mannosylated LigANI Produced in *Pichia pastoris* Protects Hamsters Against Leptospirosis. **Current Microbiology**, Nova York, v.68, n.4, p.524-530, 2014.

HAUK, P.; MACEDO, F.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; BARBOSA, A. S.; HO, P. L. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infection and immunity**, v.76, n.6, p.2642–2650, 2008.

HAUPT, K.; REUTER, M.; ELSEN, J. V. D.; BURMAN, J.; HALBICH, S.; RICHTER, J.; SKERKA, C.; ZIPFLE, P. F. The *Staphylococcus aureus* Protein Sbi Acts as a Complement Inhibitor and Forms a Tripartite Complex with Host Complement Factor H and C3b. **PLoS Pathogens**, v.4, n.12, 2008.

HEINEN, S.; HARTMANN, A.; LAUER, N.; WIEHL, U.; DAHSE, H.; SCHIRMER, S.; GROPP, K.; ENGHARDT, T.; HALBICH, S.; SCHLOTZER-SCHREHARDT, U.; ZIPFEL, P. F.; SKERKA, C. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. **Blood**, v.114, n.12, p. 2439–2447, 2009.

HELLWAGE, J.; MERI, T.; HEIKKILA, T.; ALITALO, A.; PANELIUS, J.; LAHDENNE, P.; SEPPALA, I. J. T.; MERI, S. The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. **The Journal of biological chemistry**, v.276, n.11, p.8427–8435, 2001.

HOKE, D. E.; EGAN, S.; CULLEN, P. A.; ADLER, B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infection and immunity**, v.76, n.5, p.2063–2069, 2008.

HUNG, C.; CHANG, C.; TIAN, Y.; WU, M.; YU, C.; PAN, M.; VANDEWALLE, A.; YANG, C. Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll-like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase. **Nephrology, dialysis, transplantation : European Renal Association**, v.21, n.4, p.898–910, 2006.

INVITROGEN. **Discover a star-studded cast of competent cells:** for all your transformation needs. 2003. Disponível em:
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/710-021761-B%20Comp%20Cell%20Fin.pdf>

JAIN, M.; NIGAM, R. K.; MALIK, R. A review of laboratory techniques for detecting leptospirosis. **International Journal of Current Pharmaceutical Research.** v.7, n.3, p.1–5, 2015.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS JR, P.; WALPORT, M.; SHLLOMCHIK, M. The Immune System in Health and Disease. In: **Immunobiology.** 5.ed. Nova Iorque, Garland Science, 2001.

JANULCZYK, R., IANNELLI, F., SJOHOLM, A. G., POZZI, G. & BJORCK, L. Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. **Journal of Biological Chemistry.** v.275, p.37257–37263, 2000.

JARVA, H.; RAM, S.; VOGEL, U.; BLOM, A. M.; MERI, S. Binding of the complement inhibitor C4bp to serogroup B *Neisseria meningitidis*. **Journal of immunology.** v.174, n.10, p.6299–307, 2005.

JIN, D.; OJCIUS, D. M.; SUN, D.; DONG, H.; LUO, Y.; MAO, Y.; YAN, J. *Leptospira interrogans* induces apoptosis in macrophages via caspase-8- and caspase-3-dependent pathways. **Infection and immunity,** v.77, n.2, p.799–809, 2009.

JOHNSON, R. C.; MUSCHEL, L. H. Antileptospiral Activity of Normal Serum. **Journal of bacteriology,** v.89, n.2, p.1625–6, 1965.

JONGERIUS, I.; SCHUIJT, T.; MOOI, F. Complement evasion by *Bordetella pertussis*: implications for improving current vaccines. **Journal of molecular medicine,** v.93, n.4, p.395–402, 2015.

JOUGLARD, S.D.M.M.A., VAZ, E.K., BASTOS, R.G., DA CUNHA, C.W. & ARMOA, G. R. G. DELLAGOSTIN, O.A. An ultra-rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. **Abstracts American Society for Microbiology.** v.71. p. 234, 2002.

KIRJAVAINEN, V.; JARVA, H.; BIEDZKA-SAREK, M.; BLOM, A. M.; SKUMIK, M.; MERI, S. Yersinia enterocolitica Serum Resistance Proteins YadA and Ail Bind the Complement Regulator C4b-Binding Protein. **PLoS Pathogens**, v.4, n.8, 2008.

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

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v.22, n.11-12, p.1545–1552, 2004.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: Past, present, and future. **Symposium**, v.51, n.3, p.210-214, 2005

KOPP, A.; HEBECKER, M., SVOBODOVA, E.; JOZSI, M. Factor h: a complement regulator in health and disease, and a mediator of cellular interactions. **Biomolecules**, v.2, n.1, p.46–75, 2012.

KRAICZY, P.; HELLWAGE; SKERKA, C.; BECKER, H.; KIRSCHFINK, M.; SIMON, M. M.; BRADE, V.; ZIPFLE, P. F.; WALLICH, R. Complement resistance of *Borrelia burgdorferi* correlates with the expression of BbCRASP-1, a novel linear plasmid-encoded surface protein that interacts with human factor H and FHL-1 and is unrelated to Erp proteins. **Journal of Biological Chemistry**. v.279, n.1, p.2421–2429, 2004.

LAMBERT, A.; PICARDEAU, M.; HAAKE, D. A.; SERMSWAN, R. W.; SRIKRAM, A.; ADLER, B., MURRAY, G. A. FlaA Proteins in *Leptospira interrogans* Are Essential for Motility and Virulence but Are Not Required for Formation of the Flagellum Sheath. **Infection and Immunity**, v.80, n.6, p.2019–2025, 2012.

LAMBRIS, J. D.; RICKLIN, D.; GEISBRECHT, B. V. Complement evasion by human pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, n.2, p.132–142, 2008.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology**, v.14, n.2, p.296–326, 2001.

LEVETT, P. N. Systematics of *Leptospiraceae*. In: Adler, B. **Leptospira and Leptospirosis**, Berlin: Springer, 2015. p.11-17.

LIAO, S. SUN, A.; OJCIUS, D. M.; WU, S.; ZHAO, J.; YAN, J. Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. **BMC microbiology**, v.9, p.253, 2009.

LIN, Y.; LEE, D.; MCDONOUGH, S. P.; NICHOLSON, L. K.; SHARMA, Y.; CHANG, Y. Repeated domains of leptospira immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. **The Journal of biological chemistry**, v.284, n.29, p.19380–19391, 2009.

LIN, Y.-P.; CHANG, Y.-F. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. **Biochemical and biophysical research communications**, v.362, n.2, p. 443–448, 2007.

LOURDAULT, K.; WANG, L.; VIEIRA, A.; MATSUNAGA, J.; MELO, R.; LEWIS, M. S.; HAAKE, D. A.; GOMES-SOLECKI, M. Oral immunization with escherichia coli expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with leptospira interrogans serovar Copenhageni. **Infection and Immunity**, v.82, p.893–902, 2014.

MADICO, G.; WELSCH, J. A.; LEWIS, L. A.; MCNAUGHTON, A.; PERLMAN, D. H.; COSTELLO, C. E.; NGAMPASUTADOL, J.; VOGEL, U.; GRANOFF, D. M.; RAM, S. The meningococcal vaccine candidate GNA1870 binds the complement regulatory protein factor H and enhances serum resistance. **Journal of immunology**, v.177, n.1, p.501–510, 2006.

MARTINEZ-LOPEZ, D. G.; FAHEY, M.; COBURN, J. Responses of human endothelial cells to pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.12, p.1–11, 2010.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular microbiology**, v.49, n.4, p.929–45, 2003.

MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; XU, X.; HAAKE, D. A. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. **Infection and Immunity**, v.73, n.1, p.70–78, 2005.

MCBRIDE, A J.; CERQUEIRA, G. M.; SUCHARD, M. A.; MOREIRA, A. N.; ZUERNER, R. L.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infect Genet Evol**, v.9, p.196–205, 2009.

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

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infection and immunity**, v.65, n.2, p.729–38, 1997.

MERI, S.; JORDENS, M.; JARVA, H. Microbial complement inhibitors as vaccines. **Vaccine**, v.26, n.8, p.113–117, 2008.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da saúde. Leptospirose, Situação epidemiológica / Dados. 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 01 nov. 2015.

MISASI, R.; HUEMER, H.; SCHWAEBLE, W.; ÖLDER, E.; LARCHER, C.; DIERICH, M. Human complement factor H: an additional gene product of 43 kDa isolated from human plasma shows cofactor activity for the cleavage of the third component of complement. **Eur J Immunol**. v.19, n.9, 1989.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway 7^aed.** Porto Alegre: Artmed, 2010. 899p.

MURRAY, G. The molecular basis of leptospiral pathogenesis. In: Adler, B, **Leptospira and Leptospirosis**, Berlin: Springer, 2015. p.139-165

MURRAY, G.; LO, M.; BULACH, D.M.; SRIKRAM, A.; SEEMANN, T.; QUINSEY, N. S.; SERMSWAN, R. W.; ALLEN, A.; ADLER, B. Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo for protection against kidney colonisation. **Vaccine**, v.31, n.3, p.495–499, 2013.

NAHORI, M.; FOURNIÉ-AMAZOUZ, E.; QUE-GEWIRTH, N. S.; BALLOY, V.; CHIGNARD, M.; RAETS, C. R. H.; GIRONS, I. S.; WERTS, C. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. **Journal of immunology**, v.175, p. 6022–6031, 2005.

NILSSON, U. R.; MULLER-EBERHARD, H. J. Isolation of globulin from human sérum and its characterization as the fifth component of complement. **Journal of Experimental Medicine**. v.122 n.2, p. 277–298, 1965.

OLIVEIRA, R. DOMINGOS, R. F.; SIQUEIRA, G. H.; FERNANDES, L. G.; SOUZA, N. M.; VIEIRA, M. L.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Adhesins of *Leptospira interrogans* mediate the interaction to fibrinogen and inhibit fibrin clot formation in vitro. **PLoS neglected tropical diseases**, v.7, n.8, 2013.

OLIVEIRA, R.; DE MORAIS, Z. M.; GONÇALVES, A. P.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PloS one*, v.6, n.7, 2011.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v.43, n.1, p.1–9, 2013.

PINNE, M.; HAAKE, D. A. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies. **PLoS ONE**, v.8, n.1, 2013.

PIZZA, M., DONNELLY, J. & RAPPUOLI, R. Factor H-binding protein, a unique meningococcal vaccine antigen. **Vaccine**, v.26, n. 8, p.146–148, 2008.

RAJAPAKSE, S. RODRIGO, C.; HANDUNNETTI, S. M.; FERNANDO, S. D. Current immunological and molecular tools for leptospirosis: diagnostics, vaccine design, and biomarkers for predicting severity. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.14, n.2, 2015.

RAJA, V.; NATARAJASEENIVASAN, K. Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of leptospiral outer membrane proteins (OMPs). **Critical reviews in microbiology**, v.7828, p.1–17, 2013.

RAMOS, C. R. R.; ABREU, P. A. E.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal his-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.8, p.1103–1109, 2004.

SANTI, I.; MAIONE, D.; GALEOTTI, C. L.; GRANDE, G.; TELFORD, J. L.; SORIANI, M. BibA induces opsonizing antibodies conferring in vivo protection against group B Streptococcus. **The Journal of infectious diseases**, v.200, p.564–570, 2009.

SANTOLAYA, M. E.; O'RYAN, M. L.; VALENZUELA, M. T.; PRADO, V.; VERGARA, R.; MUÑOZ, A.; TONEATTO, D.; GRAÑA, G.; WANG, H.; CLEMENS, R.; DULL, P. M. Immunogenicity and tolerability of a multicomponent meningococcal serogroup B (4CMenB) vaccine in healthy adolescents in Chile: A phase 2b/3 randomised, observer-blind, placebo-controlled study. **The Lancet**, v.379, n.9816, p.617–624, 2012.

SANTOS, A. C. dos. **Diagnóstico sorológico da leptospirose: benefício de amostra aguda tardia na confirmação de casos.** 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Medicina Investigativa) - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011

SCHACHERN, P.; TSUPRUN, V.; FERRIERI, P.; BRILES, D.; GOETZ, S.; CUREOGLU, S.; PAPARELLA, M. M.; JUHN, S. **Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v.78, n.9, p.1517-1521, 2014.

SEIXAS, F. K.; SILVA, E. F.; HARWIG, D. D.; CERQUEIRA, G. M.; AMARAL, M.; FAGUNDES, M.; DOSSA, R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the LipL32 antigen of Leptospira interrogans protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v.26, p.88–95, 2007

SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R.; SCARSELLI, M.; GROS, P.; VAN STRIJP, J. A. G. Molecular mechanisms of complement evasion: Learning from staphylococci. **Nature Reviews: Microbiology**. v.8, 2010.

SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein liga confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, n.33, p.6277-6286, 2007

SIQUEIRA, G. H.; ATZIGEN, M. V.; ALVES, I. J.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Characterization of three novel adhesins of leptospira interrogans. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.89, n.6, p1103–1116, 2013.

SMYTHE, L.; ADLER, B.; HARTSKEERL, R.; GALLOWAY, R.; TURENNE, C.; LEVETT, P. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthiellii* sp. nov., *Leptospira terpstreae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, n.5, p.1859–1862, 2013.

SOUZA, N. M.; VIEIRA, M.; ALVES, I. J.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. **Microbial Pathogenesis**, v.53, n.3-4, p.125–134, 2012.

STEVENSON, B.; CHOY, H.; PINNE, M.; ROTONDI, M.; MILLER, C.; DEMOLL, E.; KRAICZY, P.; COOLEY, A.; CREAMER, T.; SUCHARD, M.; BRISSETE, C.; VERMA, A.; HAAKE, D. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. **PLoS ONE**, v.2, n.11, 2007.

TOOT, A. L. **Localization and characterization of C-type lectin- like family of proteins in *Leptospira interrogans***. 2007. 106 f. Thesis (Master of Science). Iowa State University, Ames, 2007.

VERMA, A. HELLWAGE, J.; ARTIUSHIN, S.; ZIPFEL, P. F.; KRAICZY, P.; TIMONEY, J. F.; STEVENSON, B. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v.74, n.5, p.2659–2666, 2006.

VIEIRA, M. L.; ATZIGEN, M. V.; OLIVEIRA, T. R.; OLIVEIRA, R.; ANDRADE, D; M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. **PloS one**, v.5, n.6, 2010.

VINH, T.; ADLER, B.; FAINE, S. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. **Journal of general microbiology**, v.132, n.1, p.103–109, 1986.

VIRIYAKOSOL, S.; MATTHIAS, M. A.; SWANCUTT, M. A.; KIRKLAND, T. N.; VINETZ, J. M. Toll-Like Receptor 4 Protects against Lethal. **Society**, v.74, n.2, p.887–895, 2006.

WEILER, J. M.; DAHA, M. R.; AUSTEN, K. F.; FEARON, D. T. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.73, n.9, p.3268–3272, 1976.

WHO. **Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control.** Malta, 2003. 122 p.

WOLFF, D. G.; CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; ABE, C. M.; MONARIS, D.; MORAIS, Z. M.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; ISAAC, L.; ABREU, P. A. E.; BARBOSA, A. S. Interaction of *Leptospira* elongation factor Tu with plasminogen and complement factor H: A metabolic leptospiral protein with moonlighting activities. **PLoS ONE**, v.8, n.11, p.1–10, 2013.

YAN, W. FAISAL, S. M.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; BARR, S. C.; CHANG, C.; PAN, M.; CHANG, Y. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. **Microbes and Infection**, v.11, n.2, p.230–237, 2009.

YANG, C.; HUNG, C.; TIAN, Y.; CHANG, C.; PAN, M.; VANDEWALLE, A. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney international*, v.69, n.5, p.815–822, 2006.

ZUERNER, R. Host response to *Leptospira* infection. In: Adler, B, **Leptospira and Leptospirosis**, Berlin: Springer, 2015. p.223-250.