

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

**Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia**



Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso

**Avaliação da estabilidade de plasmídeos recombinantes
e da toxicidade de proteínas de *Leptospira interrogans*
em duas diferentes cepas de *Escherichia coli***

Guilherme Roig Pureza Inda

Guilherme Roig Pureza Inda

Avaliação da estabilidade de plasmídeos recombinantes e da toxicidade de proteínas de *Leptospira interrogans* em duas diferentes cepas de *Escherichia coli*

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Daiane Drawanz Hartwig

Pelotas, 2015

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

I38a Inda, Guilherme Roig Pureza

Avaliação da estabilidade de plasmídeos recombinantes e da toxicidade de proteínas de *Leptospira interrogans* em duas diferentes cepas de *Escherichia coli* / Guilherme Roig Pureza Inda. – 50f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015. – Orientadora Daiane Drawanz Hartwig ; coorientadora Thaís Larré Oliveira.

CDD: 616.926

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Daiane Drawanz Hartwig, Universidade Federal de Pelotas

MSc. Thaís Larré Oliveira, Universidade Federal de Pelotas

Drª Danielle da Silva Trentin, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Aos meus pais, Antonio e Janine, e às minhas irmãs Gabriela e Rafaella, por toda a compreensão, apoio e incentivo para a realização dessa conquista;

À minha namorada, Liara Barbosa, pelas palavras de carinho, pela confiança, pela força, pela paciência nos momentos de ansiedade, e por todo o amor transmitido durante esses 4 anos de graduação;

Aos meus amigos de vida, que fizeram esta jornada ser muito mais leve, pelos momentos de muita risada e descontração;

Aos meus amigos da 5ª Turma de Biotecnologia, pelo ótimo convívio, risadas, pela variedade de esportes praticados ao longo desses anos, pelos inúmeros Leões que me deixaram mais pobre, e pelos momentos tensos de provas e trabalhos em grupo;

Aos colegas do Laboratório de Vacinologia, em especial à Thaís e ao Schuch, pela paciência, cuidado e por tudo que me ensinaram durante esses 2 anos de estágio;

À minha orientadora, Daiane Drawanz Hartwig, pela confiança, conhecimento e paciência, além da oportunidade de poder acompanhar um excelente grupo do qual eu tenho muito orgulho de fazer parte;

À Universidade Federal de Pelotas por oferecer um curso de graduação de qualidade;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Muito Obrigado!

Nunca me disseram que a jornada seria fácil, mas sempre soube que a chegada valeria a pena...

Resumo

INDA, Guilherme Roig Pureza. **Avaliação da estabilidade em *Escherichia coli* de plasmídeos contendo genes que codificam para seis diferentes proteínas de *Leptospira interrogans*** 2015. 50f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A tecnologia do DNA recombinante baseia-se na transferência gênica entre organismos, onde a recombinação do DNA é proveniente de diferentes fontes. Nesta área, o processo de clonagem destaca-se, sendo os plasmídeos os vetores mais utilizados. A tecnologia recombinante está pavimentando o caminho para o uso terapêutico de moléculas complexas, razão pela qual um número crescente de produtos biológicos é baseado em proteínas recombinantes. Durante as últimas duas décadas, uma grande variedade de proteínas recombinantes têm sido produzidas utilizando a bactéria *Escherichia coli*, sistema bem estabelecido e que apresenta inúmeros fatores positivos, mas também alguns negativos, como: a toxicidade da proteína heteróloga e a instabilidade do plasmídeo contendo o gene exógeno. A leptospirose é uma zoonose causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. A utilização de vacinas recombinantes de subunidade utilizando antígenos conservados em diferentes sorovares da bactéria tem sido foco de inúmeras pesquisas. Com o presente trabalho, buscamos avaliar a estabilidade de plasmídeos contendo genes que codificam para seis diferentes proteínas de *Leptospira interrogans*, bem como, a toxicidade das mesmas, utilizando como sistema de expressão duas cepas de *Escherichia coli* (BL21 Star e C43 (DE3)). Com isso, pretende-se estabelecer uma plataforma de expressão mais rentável para a produção de proteínas recombinantes de *L. Interrogans* as quais poderão ser avaliadas como novas composições vacinais ou em testes diagnóstico. Os testes de toxicidade foram avaliados em dois conjuntos de placas ágar LB-ampicilina, sendo um conjunto contendo o indutor IPTG e o outro não. A toxicidade dos plasmídeos foi definida através da ausência de colônias em placas contendo ampicilina e o indutor, e na presença de colônias nas placas contendo apenas ampicilina. Para os testes de estabilidade, a cada 1h de indução da expressão da proteína, uma série de diluições dos cultivos foram preparadas e, para cada diluição, 20 µl foram imediatamente plaqueados em placas de ágar LB com e sem ampicilina. A estabilidade de cada um dos plasmídeos foi estabelecida como a razão entre o número de colônias crescidas nas placas contendo ampicilina sobre o número de colônias crescidas nas placas sem ampicilina. Na cepa BL21 Star, todas as proteínas testadas foram tóxicas para a bactéria, bem como os plasmídeos se mostraram instáveis durante a expressão das proteínas. Para a cepa C43 (DE3), nenhuma proteína se mostrou tóxica, e os plasmídeos apresentaram maior estabilidade em relação a outra cepa.

Palavras-chave: DNA recombinante; *Escherichia coli* BL21 Star; *Escherichia coli* C43 (DE3); toxicidade; estabilidade; *Leptospira interrogans*.

Abstract

INDA, Guilherme Roig Pureza. **The assessment of the stability in *Escherichia coli* of plasmids containing genes encoding six different proteins of *Leptospira interrogans*.** 2015. 50f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The recombinant DNA technology is based on genetic transfer between organisms where the recombination of the DNA comes from different sources. In this field, the cloning process stands out; being the plasmids the most commonly used vectors. The recombinant technology is paving the way for the therapeutic use of complex molecules, reason why a growing number of organic products of common use is based on recombinant proteins. Over the past two decades, a variety of recombinant proteins has been produced using *Escherichia coli*, a well-established system which has numerous positive factors, but also some negatives ones, such as the toxicity of the heterologous protein as well as the plasmid instability containing the exogenous gene. With the present study, we seek to evaluate the stability of plasmids containing genes that encode six different proteins of *Leptospira interrogans*, as well as their toxicity, using as expression system two strains of *Escherichia coli* (BL21 Star and C43 (DE3)). The toxicity tests were assessed in two sets of LB-ampicillin agar plates, one containing the inducer IPTG and the other not. The toxicity of the plasmids was defined by the absence of colonies on plates containing ampicillin and the inducer, and in the presence of colonies on plates containing only ampicillin. For the stability tests, at each 1H induction, a series of dilutions of the cultures were prepared, and for each dilution, 20 µl were immediately plated on LB agar plates with and without ampicillin. The stability of each of the plasmids was established as the ratio of the number of colonies grown on ampicillin-containing plates over the number of colonies grown on plates without ampicillin. In the strain BL21 Star, all tested proteins were toxic to the bacteria as well as the plasmids proved unstable during the expression of proteins. For the strain C43 (DE3) no protein proved toxic, and the plasmids presented higher stability compared to the other strain.

Keywords: Recombinant DNA; *Escherichia coli* BL21 Star; *Escherichia coli* C43 (DE3); toxicity; stability; *Leptospira interrogans*.

Lista de Figuras

Figura 1	Clonagem e expressão de genes exógenos.....	15
Figura 2	Curva de crescimento das cepas BL21 Star e C43 (DE3) transformadas com os plasmídeos recombinantes e induzidas com IPTG.....	38

Lista de Tabelas

Tabela 1	Análise da toxicidade das proteínas recombinantes LigANI, LigBNI, LigBrep, LipL32, OmpL37 e ErpY-like expressas nas cepas de <i>E. coli</i> BL21 Star e C43 (DE3).....	36
Tabela 2	Avaliação da estabilidade dos plasmídeos recombinantes nas cepas de <i>E. coli</i> C43 (DE3) e BL21 Star.....	40

Lista de Abreviaturas e Siglas

LPS	Lipopolissacarídeo
CHO	<i>Chinese hamster ovary cell</i>
DO	Densidade óptica
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
h	Horas
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
IB	<i>Inclusion Bodies</i>
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MAT	Soroaglutinação microscópica
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
min	Minuto
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SMGT	<i>Sperm Mediated Gene Transfer</i>
$^{\circ}$ C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Tecnologia DNA recombinante.....	15
2.2 Sistemas de expressão de antígenos heterólogos.....	18
2.3 <i>E. coli</i> como hospedeiro para expressão de antígenos heterólogos.....	21
2.3.1 <i>E. coli</i> BL21 Star™(DE3) e BL21 Star™(DE3) pLysS.....	23
2.3.2 C41 (DE3) e C43 (DE3).....	24
2.3.3 Rosseta™ e Rosseta™ 2.....	24
2.3.4 Origami™ e Origami™ B.....	25
2.4 Leptospirose.....	25
2.5 Antígenos alvo de <i>Leptospira</i>	29
2.5.1 LipL32.....	29
2.5.2 OmpL37.....	29
2.5.3 LigANI, LigBNI e LigBrep.....	30
2.5.4 ErpY-like.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Cepas e plasmídeos.....	33
4.2 Transformação das cepas de <i>E. Coli</i>	33
4.3 Testes de toxicidade.....	33
4.4 Testes de estabilidade.....	34
4.5 Avaliação da taxa de crescimento celular.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Testes de Toxicidade.....	36
5.2 Taxa de crescimento celular.....	37
5.3 Testes de estabilidade.....	40
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
7. CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

A principal molécula envolvida nas diferentes tecnologias empregadas em biologia molecular é o gene. Uma das técnicas de isolamento e propagação de um gene de interesse, é sua inserção em outra molécula de DNA que sirva como veículo ou vetor passível de ser replicado em células vivas. Existem muitas opções de vetor, dependendo da finalidade de clonagem, dentre os quais, os plasmídeos são, atualmente, os mais utilizados. Quando esses dois DNAs de diferentes origens são combinados, o resultado é uma molécula de DNA recombinante (MULLIS, 1990). Essa tecnologia pode ser utilizada no estudo de mecanismos de replicação e expressão gênica, na determinação da sequência de um gene e conseqüentemente da proteína que ele codifica, ou no desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir substâncias úteis, tais como vacinas e enzimas (NASCIMENTO et al., 2003).

Diferentes células ou organismos vêm sendo utilizados para a produção de proteínas recombinantes (HAUKAAS, 2011). Devido ao vasto conhecimento sobre sua genética, bioquímica e biologia molecular, a bactéria *Escherichia coli* é bastante empregada na expressão de proteínas heterólogas. O sistema de expressão baseado em *E. coli* é relativamente barato, de fácil manipulação e muitas proteínas recombinantes são bem toleradas, podendo ser expressas em níveis elevados (SAMBROOK et al., 2001). Existem, no entanto, problemas relacionados à utilização dessa bactéria como maquinaria de produção de proteínas heterólogas, como: a formação de corpos de inclusão, acúmulo de endotoxinas (lipopolissacarídeo_LPS), a expressão de proteínas recombinantes que são tóxicas, a inabilidade da bactéria realizar modificações pós-traducionais e a instabilidade plasmidial (LEONHARTSBERGER, 2006; MAKRIDES, 1996; PETSCH, 2000; SAIDA et al., 2006).

Vários antígenos têm sido expressos em *E. coli*, dentre eles os de *Leptospira interrogans*, uma espiroqueta patogênica capaz de causar uma zoonose, denominada leptospirose (WHO, 2003). Estima-se que ocorram mais de 1 milhão de casos desta doença em humanos, com aproximadamente 59 mil

mortes por ano no mundo (COSTA et al., 2015). A infecção é contraída por contato direto ou indireto com urina de animais portadores (principalmente roedores), via solo, água ou alimentos contaminados, sendo geralmente relacionada à falta de saneamento básico, superpopulação, atividades recreativas e ocupacionais (EVANGELISTA; COBURN, 2010; PLANK; DEAN, 2000). Para o diagnóstico da doença, o teste de aglutinação microscópica (MAT) é considerado padrão, porém, é inadequado para identificação rápida do caso, uma vez que requer análises de soros emparelhados para alcançar sensibilidade suficiente, além de ser trabalhoso e subjetivo (FLANNERY et al., 2001). Com isso, vários esforços vem sendo feito para desenvolver novos testes sensíveis e específicos para a leptospirose, como testes rápidos baseados em antígenos recombinantes da bactéria (YAN et al., 2013). Diante das desvantagens do uso de bacterinas como vacinas, a necessidade de novas estratégias vacinais para a prevenção de leptospirose tornou-se importante. Conseqüentemente, vários estudos têm investido na obtenção e avaliação de antígenos recombinantes de *Leptospira*, conservados em diferentes sorovares, capazes de induzir imunidade protetora contra a doença (DELLAGOSTIN et al., 2011).

LigANI, LigBNI, LigBrep, LipL32, OmpL37 e ErpY-like são proteínas de *Leptospira*, presentes em diferentes sorovares patogênicos da bactéria e ausente em espécies saprófitas, sugerindo o papel delas no processo de infecção e tendo potencial como antígenos vacinais. Alguns estudos demonstram a capacidade dessas proteínas para o desenvolvimento testes de diagnóstico, e de induzirem resposta imune contra a bactéria durante a infecção (FORSTER et al., 2013; GRASSMANN et al., 2012; HARTWIG et al., 2015; HARTWIG et al., 2014; LUCAS et al., 2010; MONTE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2007).

Nesse sentido, este trabalho de conclusão de curso propõe a avaliação da estabilidade de um conjunto de plasmídeos que codificam para as seis proteínas de *Leptospira interrogans* mencionadas acima, bem como, a toxicidade das mesmas, utilizando duas cepas de *E. coli*: BL21 Star (DE3) e C43 (DE3). Pretende-se, assim, estabelecer uma plataforma de expressão mais rentável para a produção de proteínas recombinantes de *L. interrogans* a serem utilizadas como antígenos em novas composições vacinais ou em testes diagnóstico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tecnologia DNA recombinante

Um DNA recombinante é obtido através da combinação de duas moléculas de DNA pertencentes a espécies diferentes (ETIEMME, 2003). A clonagem gênica baseia-se na obtenção de um gene que codifica para uma proteína de algum organismo e inserção em um vetor de clonagem, para que esta molécula recombinante seja introduzida em uma bactéria ou outro sistema de expressão (BROWN, 2003). A Figura 1 ilustra o processo de clonagem e expressão de proteínas exógenas.

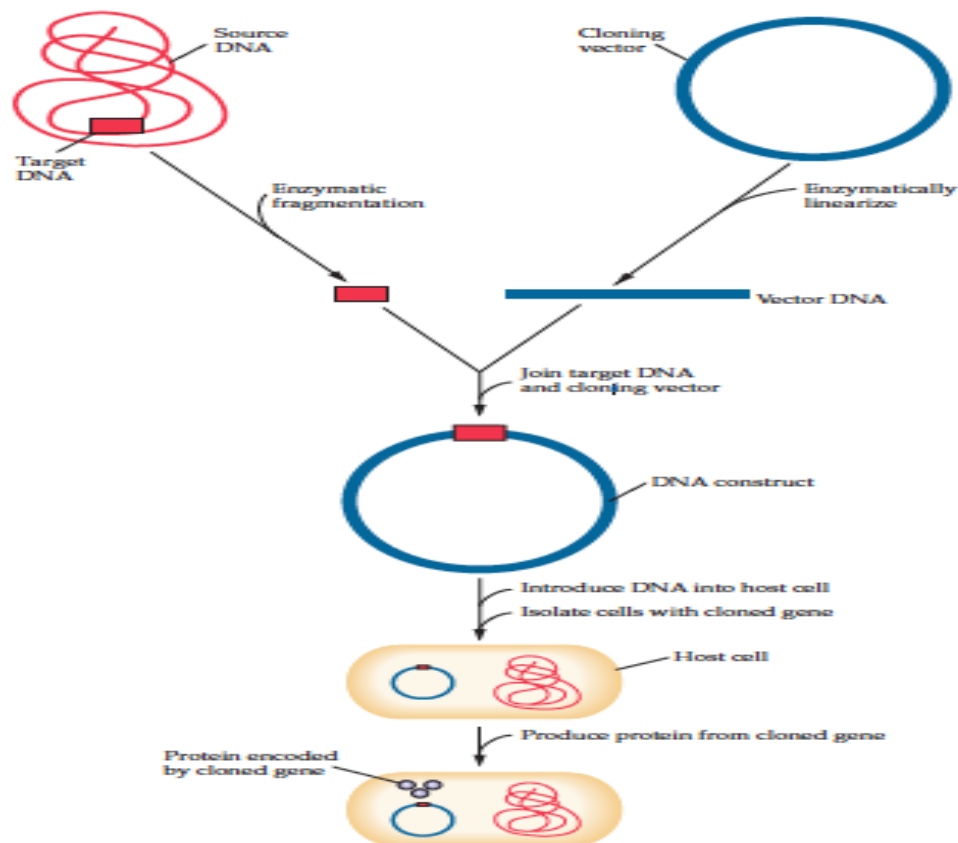


Figura 1. Clonagem e expressão de genes exógenos (GLICK, 2010).

Através dessa tecnologia é possível estudar mecanismos de replicação e expressão gênica, determinar a sequência de um gene e conseqüentemente da proteína que ele codifica, ou desenvolver culturas microbianas capazes de produzir substâncias úteis, tais como a insulina humana, hormônio de crescimento, vacinas e enzimas em grandes quantidades. Sua aplicação comercial ou biotecnológica parece ter um potencial inesgotável (NASCIMENTO et al., 2003).

A tecnologia do DNA recombinante teve início no final dos anos 70, refletindo um grande progresso para o entendimento e combate de doenças (BELLÃO, 2006). Em 1975 o primeiro anticorpo monoclonal foi produzido; no ano de 1977 um gene humano foi clonado em bactéria, assim como, um gene que codifica para a insulina de rato. Em 1978 a insulina humana e o hormônio do crescimento foram produzidos, e o DNA bacteriano foi introduzido em cromossomo de levedura (DEMAIN, 2001). Dessa forma, a tecnologia do DNA recombinante começou a ganhar espaço e ter reconhecimento.

Para o processo de clonagem molecular, o descobrimento e o uso de endonucleases de restrição foram imprescindíveis. O inserto para clonagem é obtido e clivado por essas enzimas, as quais reconhecem e cortam sequências de nucleotídeos específicos dentro do DNA, deixando extremidades de fitas simples que permitem a ligação do inserto no vetor (LEHNINGER et al., 1993). As enzimas de restrição atuam como uma espécie de "tesoura biológica", na medida em que são produzidas naturalmente por bactérias como forma de defesa contra infecção viral, onde clivam em diversos fragmentos o material genético dos vírus, impedindo sua reprodução na célula bacteriana. Em contrapartida, a bactéria protege seu próprio DNA dessa degradação, modificando sua sequência de reconhecimento pela adição de grupos metila, fenômeno conhecido como metilação (PIERCE, 1994).

Cada bactéria tem suas próprias enzimas de restrição e cada enzima reconhece apenas um tipo de sequência, independente da fonte de DNA (BURNS & BOTTINO, 1991). A utilidade dessas enzimas no processo de clonagem vem de sua especificidade em clivar DNA em sítios particulares. Essas enzimas reconhecem sítios de 6 ou 4 nucleotídeos, e estes fragmentos são

suficientemente longos para conter informação genética ao mesmo tempo que suficientemente pequenos para permitir uma manipulação física e bioquímica conveniente *in vitro* (BAILEY e OLLIS, 1986). Tudo isso significa que o DNA de qualquer origem pode ser ligado a moléculas de DNA de qualquer outra espécie, abrindo a possibilidade de clonar genes e isolar proteínas (NASCIMENTO et al., 2003).

Após a obtenção do DNA a ser clonado e a digestão com as enzimas de restrição, a molécula precisa ser ligada a um vetor de clonagem. O passo de ligação é feito através da enzima DNA ligase, que catalisa a união de duas moléculas de DNA com uma ligação fosfodiéster entre a hidroxila 3' de um nucleotídeo e o fosfato 5' de outro (LEHNINGER et al., 1993). São características importantes para todo vetor de clonagem: ser capaz de se replicar independentemente junto ao DNA exógeno que carrega; conter um sítio único de clivagem por endonucleases de restrição; apresentar um marcador de seleção – geralmente sob a forma de genes de resistência a antibióticos – para distinguir as células hospedeiras que contêm o vetor daquelas que não o contêm; e ser relativamente fácil de recuperar a partir da célula hospedeira (MULLIS, 1990). Existem muitas opções possíveis de vetor, dependendo da finalidade de clonagem; em geral, os mais utilizados são os plasmídeos.

Plasmídeos são pequenas moléculas de DNA circular, transferidos horizontalmente, entre as bactérias, pelo processo de conjugação. A identificação e classificação são baseadas em suas características genéticas permanentemente apresentadas, a saber: capacidade de se preservar numa célula hospedeira e capacidade de controlar um processo de replicação (SELIMOVIC, et al., 2007). Os plasmídeos têm a capacidade de se duplicar autonomamente, possuindo, em geral, genes que lhes conferem resistência a antibióticos (CANDEIAS, 1991).

Após o processo de ligação do inserto no vetor, o produto de ligação (plasmídeo recombinante) é transformado, por métodos físicos ou químicos, em bactérias para propagação. A obtenção de um clone recombinante depende da identificação das células que contêm o plasmídeo com o fragmento alvo clonado.

Para tanto, podem ser aplicadas as técnicas de PCR, digestão com enzimas de restrição e/ou sequenciamento de DNA (BROWN, 2011).

2.2 Sistemas de expressão de antígenos heterólogos

Tecnologias do DNA recombinante estão sendo empregadas na produção de moléculas de uso terapêutico, de forma que um número crescente de produtos biológicos de uso corriqueiro são proteínas recombinantes (SODOYER, 2004). Os mecanismos semelhantes entre a síntese de proteínas em células procarióticas e eucarióticas têm sido utilizados para o desenvolvimento de sistemas de expressão e, assim, diferentes células ou organismos têm sido empregados para a produção de proteínas recombinantes (HAUKAAS, 2011). A escolha do hospedeiro é baseada na eficiência de produção da proteína de interesse. O ideal é que o hospedeiro sintetize a proteína de interesse com o mesmo molde de glicosilação, fosforilação e acetilação encontrado quando a proteína é isolada na sua forma nativa (GLICK, 1995).

A necessidade de novas plataformas de expressão adequadas aumenta com o número de genes-alvos utilizados em vários ramos industriais. Uma gama de sistemas de expressão já são utilizados, como bactérias, leveduras, fungos filamentosos e células de outros eucariotos, como mamíferos, insetos e plantas. Ao escolher entre essas células, ambos os aspectos qualitativos e econômicos devem ser considerados. A qualidade da proteína heteróloga produzida também é essencial, especialmente na medicina, em que a produção de produtos farmacêuticos humanos é regulada sob aspectos estritos de segurança (GELLISSEN, 2005).

Os hospedeiros procariotos são geralmente o ponto de partida na expressão de proteínas heterólogas, uma vez que são fáceis de manipular, têm tempo de geração curto e são sistemas bem estabelecidos (LARSEN, 2009). As células procariotas podem ser subdivididas em células Gram-positivas e Gram-negativas, com base na estrutura de sua parede celular. Ambos os grupos são representantes bem estabelecidos no campo da produção de proteínas

recombinantes (WATSON et al., 1992). Dentre as bactérias Gram-negativas, *E. coli* é a mais estudada, enquanto o *Bacillus subtilis* é o produtor Gram-positivo mais bem conhecido de proteínas recombinantes (LARSEN, 2009). Existem vários desafios quando se utiliza células procarióticas para expressão de proteínas, sendo os maiores problemas referentes à insolubilidade da proteína, aos níveis baixos de expressão e às limitações na realização de modificações pós-traducionais (GELLISSEN, 2005). Na teoria, hospedeiros procarióticos podem expressar qualquer gene, mas, na prática, as proteínas produzidas nem sempre têm a atividade ou estabilidade biológica desejada (HAUKAAS, 2011).

As células eucarióticas partilham muitas características moleculares, bioquímicas e genéticas que as tornam uma alternativa para a expressão de proteínas. São sistemas de escolha quando se deseja obter uma proteína parecida quando na sua forma nativa, pois é um sistema que permite modificações pós-traducionais (CEREGUINO, 2000). Hoje em dia, uma variedade de plataformas de expressão em fungos estão disponíveis, mas, inicialmente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi mais amplamente utilizada. Como a maioria das leveduras, *S. cerevisiae* apresenta as mesmas vantagens de crescimento de alguns procariotos (GLICK et al., 2010). Devido às grandes vantagens em relação aos outros sistemas de expressão, outro fungo bastante utilizado para expressão de proteínas recombinantes é a levedura *Pichia pastoris*; as técnicas requeridas para sua manipulação são semelhantes às descritas para *S. cerevisiae*, um dos sistemas mais bem caracterizados geneticamente (CEREGUINO, 2000).

A produção de proteínas através de linhagens celulares de mamífero, tais como células CHO (*Chinese hamster ovary*), tem uma vantagem na produção de proteínas humanas porque são capazes de glicosilar proteínas no mesmo padrão dos eucariotos superiores. Uma vez que isso pode resultar em proteínas recombinantes idênticas aos seus homólogos humanos, a possibilidade de produção de uma proteína funcional aumenta (HAUKAAS, 2011). Ainda assim, existem algumas desvantagens que conduzem à necessidade de sistemas alternativos: linhagens celulares de mamíferos exigem meio especializado, o que pode levar a altos custos em comparação a outros hospedeiros procarióticos; em

fermentações, a sua cinética de crescimento é lenta, apresentando densidades celulares baixas e, além disso, são sensíveis ao estresse (GELLISSEN, 2005).

Alternativa diferente para produção de proteínas recombinantes pode ser a utilização de linhagens de células de insetos. Para estes, um sistema utilizado são os baculovírus (vírus que infectam insetos), que surgiram como um sistema popular para a superprodução de proteínas recombinantes em eucariotos (RAI, 2010). Desde a descoberta de que os baculovírus podem traduzir eficientemente em células de mamífero, as aplicações destes têm se expandido em razão de diversos fatores (HU, 2004). Outras linhagens de células de insetos, tais como a 'Sf-9' e 'High-Five', apresentam a habilidade de suportar o crescimento celular e a produção de proteínas recombinantes com certas vantagens em relação a células de mamíferos (SODOYER, 2004).

Outra estratégia, empregando células eucarióticas para a expressão de proteínas recombinantes é a utilização de plantas, as quais, oferecem vantagens como apresentar maquinaria de processamento pós-traducional semelhante à dos mamífero, não carregar oncogenes humanos (BLAIS, 2006), bem como, apresentar capacidade de produção em larga escala (SODOYER, 2004), sendo comercialmente mais barata. Tais vantagens permitem a expressão de ampla variedade de antígenos para prevenção de doenças, terapias e diagnósticos (STREATFIELD, 2006). O tabaco é conhecido como planta-modelo de transformação, uma vez que a sua cultura *in vitro* já é bem estabelecida, possuindo características que facilitam o processo, como a capacidade de germinação e de regeneração, ciclo curto e ampla produção de sementes (BRASILEIRO, 1998), além disso, os genes exógenos podem ser inseridos permanentemente no genoma de todas as células vegetais, com transmissão à descendência, obtendo-se uma planta transgênica. Existe ainda uma série de sistemas de expressão transitória, os quais implicam na utilização de um plasmídeo ou na transformação de apenas algumas células ou órgãos da planta, por exemplo, via micro-organismo *Agrobacterium* (HAWES et al., 2000).

A utilização de animais transgênicos como biorreatores representa uma alternativa promissora, pois possibilita o crescimento necessário na área terapêutica, por meio da produção de proteínas recombinantes de elevado valor

biológico à saúde humana (COLLARES et al., 2007). A capacidade de animais transgênicos produzir proteínas complexas, biologicamente ativas, e de uma maneira eficiente e econômica, é superior aos demais sistemas de expressão (HOUEBINE, 2009). Isso ocorre devido à incapacidade das bactérias realizarem reações de modificações pós-traducionais, requeridas para a atividade biológica plena, e da produção lenta das plantas transgênicas e insetos (WANG et al., 2013). Diante disso, para a síntese de uma série de proteínas de interesse terapêutico, há a pertinência do uso de células animais, para que as modificações pós-traducionais adequadas sejam realizadas. Neste sentido, o uso de peixes transgênicos, por exemplo, tem demonstrado ser uma alternativa viável para a produção de proteínas recombinantes em modelos de baixo custo devido ao tempo curto de geração, à fácil manutenção dos estoques e à produção em larga escala dos animais geneticamente modificados através de SMGT - *Sperm Mediated Gene Transfer* (COLLARES et al., 2007).

Com a conclusão do sequenciamento do genoma de muitos organismos, existe uma necessidade crescente de expressão de alto rendimento de proteínas heterólogas. Os sistemas de expressão têm sido incapazes de enfrentar este desafio devido aos demorados procedimentos de clonagem e às falhas para gerar moléculas funcionais de muitas proteínas em hospedeiros bacterianos (STEVENS, 2000). O uso da expressão de proteínas isenta de células tem, agora, se tornando uma alternativa, pois oferece um simples e flexível sistema para a rápida síntese de proteínas, reduzindo drasticamente o tempo necessário do processo, englobando a sequência de DNA até à proteína funcional (JACKSON et al., 2000).

2.3 *E. coli* como hospedeiro para expressão de antígenos heterólogos

Uma grande variedade de proteínas recombinantes tem sido produzida em *E. coli* nos últimos anos (LEE, 1996). *Escherichia coli* é uma bactéria em forma de bacilo Gram-negativo, que em humanos e animais é normalmente encontrada no intestino. Essa bactéria é parte da família Enterobacteriaceae e é anaeróbica

facultativa, com temperatura ótima de crescimento de 37°C (SUSSMAN, 1997). Em meios ricos em nutrientes, durante a fase exponencial de crescimento, *E. coli* duplica a cada 20-30 min. As características atraentes desse sistema incluem genética relativamente simples, baixo custo, rápido crescimento e o potencial para o cultivo de alta densidade (QUN XU et al., 2011).

Uma grande variedade de mutantes de *E. coli* foram isolados e caracterizados. Quase todas as cepas atualmente utilizadas são derivadas de uma única cepa: a *E. coli* K-12, isolada a partir das fezes de um paciente com difteria em 1922 (CASALI, 2003). Com isso, foram desenvolvidas inúmeras linhagens geneticamente modificadas para diferentes condições de expressão, bem como, vetores a serem utilizados, ambos disponibilizados comercialmente (MAKRIDES, 1996). Considerando apenas o banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), mais de 90% das estruturas depositadas foram produzidas utilizando *E. coli* como sistema de expressão (VINCENELLI et al., 2013).

Há, contudo, problemas relacionados à utilização dessa bactéria como hospedeiro de produção de proteínas heterólogas. Algumas proteínas recombinantes acabam como parte de uma fração insolúvel no citoplasma – são frequentemente chamadas corpos de inclusão (IB) e consistem em agregados de proteínas com *folding* incorreto, que devem ser processadas para assumirem a conformação correta. Esse tratamento adicional leva a custos mais elevados e pode afetar a atividade das proteínas, por conseguinte, é desejável utilizar hospedeiros onde IB são evitados (LEONHARTSBERGER, 2006). Para a produção de proteínas terapêuticas em bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, o acúmulo de endotoxinas (LPS), que são pirogênicas, é outro problema relacionado e, assim como, para os corpos de inclusão, esse problema necessita de passos adicionais de purificação antes da proteína recombinante ser utilizada para o seu propósito original (PETSCH, 2000). Outros possíveis problemas estão relacionados ao plasmídeo ou instabilidade do RNA mensageiro (TERPE, 2006).

Problema frequente é, ainda, a expressão de proteínas recombinantes tóxicas para o hospedeiro de expressão. A questão chave na expressão em *E. coli* é um fraco controle da expressão, o que resulta no vazamento da proteína tóxica antes da indução, levando à perda do plasmídeo, ao fraco crescimento

celular e à fraca expressão proteica (SAIDA et al., 2006). Outras desvantagens do uso de *E. coli* como sistema de expressão incluem: (1) a inabilidade da bactéria realizar modificações pós-traducionais; (2) dificuldade de um mecanismo de secreção da proteína alvo para o meio de cultura; e (3) a limitada habilidade de promover a formação de pontes dissulfeto (BALBAS, 2001; MAKRIDES, 1996; SAHDEV et al., 2008).

Para a expressão de proteínas, as cepas *E. coli* BL21 e K12 e seus derivados são as mais utilizadas (TERPE, 2006). Dentre elas, as principais são abordadas na sequência.

2.3.1 *E. coli* BL21 Star™(DE3) e BL21 Star™(DE3) pLysS

A designação DE3 indica que as cepas contêm a sequência DE3, que transporta o gene para a T7 RNA polimerase, sob o controle do promotor lacUV5, induzível por isopropil β -D-1-thiogalactopiranoside (IPTG). As duas cepas carregam um gene mutado RNE (*rne131*) que codifica uma enzima RNAase truncada desprovida da capacidade de degradar mRNA, resultando num aumento da estabilidade do mRNA. As duas cepas são de *E. coli* B/r e não contêm a lon protease, sendo, também, deficientes na protease de membrana externa OmpT, o que reduz a degradação de proteínas heterólogas expressas na cepa. BL21 Star™ (DE3) pLysS carrega o plasmídeo pLysS que produz lisozima derivada do bacteriófago T7. A BL21 Star™ (DE3) não carrega um plasmídeo expressando a lisozima T7 para reduzir o nível basal da expressão do gene de interesse. pLysS confere resistência ao cloranfenicol (CAMR) e contém a origem p15A, que lhe permite ser compatível com PUC ou plasmídeos derivados de pBR322. As cepas BL21 Star™(DE3) e BL21 Star™(DE3) pLysS são adequadas para a expressão de proteínas recombinante em altos níveis (INVITROGEN).

2.3.2 C41 (DE3) e C43 (DE3)

As cepas de superexpressão C41 (DE3) e C43 (DE3) são eficazes para expressar proteínas tóxicas e de membrana a partir de todas as classes de organismos, incluindo vírus, eubactérias, leveduras, plantas, insetos e mamíferos. Resultados demonstram que essas cepas são claramente superiores em transformação e expressão de proteínas tóxicas em relação à BL21 (DE3) (DUMON-SEIGNOVERT et al., 2004). As cepas C41 (DE3) e C43 (DE3) transportam a sequência lambda DE3, que expressa T7 RNA polimerase a partir do promotor lacUV5, induzível por IPTG. Essas células podem ser usadas para expressar qualquer gene clonado num plasmídeo contendo o promotor T7. Cepas de superexpressão pLysS também carregam um plasmídeo resistente ao cloranfenicol que codifica para a lisozima T7, que é um inibidor natural da T7 RNA polimerase. As células pLysS produzem quantidade pequena de lisozima T7, que suprime a expressão basal da T7 RNA polimerase antes da indução, proporcionando, assim, estabilidade adicional para os clones recombinantes que codificam particularmente proteínas tóxicas (LUCIGEN).

2.3.3 Rosseta™ e Rosseta™ 2

Essas cepas são derivadas de cepas BL21, destinadas a expressar proteínas heterólogas que contêm códons raros em *E. coli*. As células transportam plasmídeo resistente ao cloranfenicol com os genes de tRNA para sete códons raros (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, e CGG). Os genes dos tRNA são controlados por seus promotores nativos. Em Rosetta 2 (DE3) pLacI, os genes raros de tRNA estão presentes no mesmo plasmídeo que transporta o gene repressor *lac* (NOVAGEN).

2.3.4 Origami™ e Origami™ B

As cepas Origami são derivadas da cepa K-12 e apresentam mutações em ambos os genes tioredoxina redutase (*trxB*) e glutationa redutase (*gor*), que aumentam significativamente a formação de ligação dissulfeto no citoplasma de *E. coli*. As cepas Origami 2 são sensíveis a canamicina, diferentemente das cepas originais de Origami, em que a mutação *gor* ainda está selecionada pela tetraciclina. Para reduzir a possibilidade de formação de ligações dissulfeto entre moléculas, as estirpes que contêm mutações em *trxB* e *gor* são recomendadas apenas para a expressão de proteínas que requerem formação de ligações dissulfeto para a conformação correta da proteína. As cepas Origami B são derivadas de um mutante de BL21 lacZY, para permitir um controle preciso dos níveis de expressão, ajustando a concentração de IPTG. Assim, as cepas Origami B combinam as características desejáveis de BL21, Tuner™ e Origami em uma única cepa. Essas cepas também incluem as deficiências lon e ompT de BL21, que aumentam a estabilidade da proteína (NOVAGEN).

2.4 Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Essas espiroquetas são bactérias que podem ser patogênicas (isto é, ter potencial para causar doença em animais e humanos) ou saprófitas (ou seja, de vida livre e, geralmente, não causando a doença) (WHO, 2003).

A unidade básica de taxonomia da *Leptospira* é o sorovar. Essa classificação sorológica é determinada, principalmente, pela diversidade antigênica do LPS presente em sua membrana externa. Sorovares contendo determinantes antigênicos relacionados são agrupados no mesmo sorogrupo (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001). O gênero *Leptospira* compreende 20 espécies, sendo 13 patogênicas, classificadas em mais de 260 sorovares (KO et al., 2009). Espécies que foram detectadas em casos clínicos incluem *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. inadai*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffii*.

Infelizmente, sorovares de *Leptospira* podem, frequentemente, trocar seu material genético, podendo não haver correlação entre tipagem sorológica e classificação genética (CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2013).

Leptospira tem uma estrutura típica de dupla membrana, em que a membrana citoplasmática e a camada de peptidoglicano estão intimamente associadas e são separadas da membrana externa por um espaço periplasmático. Além de LPS, as proteínas estruturais e funcionais formam parte da membrana externa de *Leptospira*. Uma expressiva proporção dessas proteínas são lipoproteínas com abundância relativa na superfície da célula: LipL32 > LipL21 > LipL41 (CULLEN et al., 2004). Proteínas integrais de membrana, tais como a porina OmpL1, também estão localizadas na membrana externa de *Leptospira* e têm sido mostradas como sendo antigênicas. Entretanto, mais de 50% dos genes de *Leptospira* são de função desconhecida, sugerindo a presença de fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade únicos ainda não elucidados (ADLER et al., 2010).

As leptospirosas foram detectadas em praticamente todos os países que realizaram investigações epidemiológicas, e a doença é mundialmente distribuída (PANDEY, 1994). Sua ocorrência tem forte associação com períodos de elevados índices pluviométricos. Em condições favoráveis e na presença dos hospedeiros adequados, as leptospirosas podem persistir por semanas ou meses no ambiente, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (PLANK et al., 2000). Em regiões de clima seco, infecções acidentais ocorrem próximo a águas represadas com alta concentração de animais. Em regiões temperadas, as infecções são sazonais e ocorrem com maior frequência nos meses chuvosos (PETRAKOVSKY et al., 2014). Em países em desenvolvimento, os casos de leptospirose humana atingem principalmente a população de baixo poder aquisitivo, e seu controle só ocorre com melhoria das condições de saneamento básico, de tratamento de água e esgoto, e com redução de condições que favorecem a disseminação de roedores, como, por exemplo, o acúmulo de lixo (OLIVEIRA et al., 2013). Estima-se que, por ano, ocorram mais de 1 milhão de casos e aproximadamente 59 mil mortes decorrentes dessa doença no mundo (TAYLOR et al., 2015).

A infecção é comum em roedores, animais silvestres e animais domésticos. Quando contaminados podem ser doentes portadores convalescentes ou portadores assintomáticos. A infecção por *Leptospira* spp. ocorre através das mucosas ou de lesões de pele, seguindo-se a multiplicação no sangue e disseminação para órgãos-alvo. No caso de animais que sobrevivem à fase aguda da leptospirose, os microrganismos alcançam o sistema renal e passam a ser excretados pela urina por períodos de tempo variados, caracterizando-os como portadores convalescentes (VASCONCELLOS, 2002). O local de preferência para colonização das leptospiras é o lúmen dos túbulos renais, onde a concentração de anticorpos é baixa, atuando como estratégia para a evasão do sistema imune (HARTSKEERL et al., 2011). Acredita-se que a patogênese da *leptospira* esteja, em parte, relacionada com a resposta imune do hospedeiro para componentes da membrana externa, como os lipopolissacarídeos e as lipoproteínas (FRAGA et al., 2013).

A doença é geralmente bifásica, caracterizada por uma fase aguda ou septicêmica na primeira semana da infecção, seguida pela fase imune, em que há disseminação das bactérias para os órgãos-alvo, produção de anticorpos e excreção das leptospiras na urina. A doença pode se manifestar como uma forma anictérica mais suave ou, mais grave, ictérica (5-10% dos casos). A taxa de letalidade é baixa (10%), mas pode atingir 70% em casos graves, caracterizados por falência múltipla de órgãos. A infecção assintomática também ocorre. A gravidade da doença varia com o sorovar e dose infectante, bem como a competência imunológica do hospedeiro (CENTRE FOR DISEASE CONTROL, 2008). Em animais de produção, a leptospirose pode resultar em distúrbios reprodutivos, como a retenção da placenta, os abortos e os natimortos; em alterações congênitas; ou em infecções inaparentes capazes de levá-los à subfertilidade, e significativas perdas no setor pecuário (ADLER et al., 2010).

O diagnóstico da leptospirose ocorre através do histórico do paciente, do contexto epidemiológico e do exame físico confirmado por exames laboratoriais complementares, através de testes sorológicos, moleculares e bacteriológicos (WHO, 2003). Os testes de diagnóstico podem ser diretos ou indiretos e destinados a detectar anticorpos, DNA ou microrganismo em tecidos e fluidos

corporais (GROOMS & BOLIN, 2005). Atualmente, o teste sorológico mais utilizado na rotina clínica e indicado como teste de referência pela Organização Mundial de Saúde é o de reação de soroaglutinação microscópica (MAT) (WHO, 2003), no qual o soro do paciente é misturado com suspensões de leptospirosas vivas de diferentes sorovares individualmente. A reação de aglutinação entre os anticorpos presentes no soro do paciente e o antígeno O do LPS de determinado sorovar bacteriano é observada ao microscópio e são determinados os títulos de diluição do soro ainda com aglutinação de pelo menos 50% das bactérias (LEVETT, 2001). Porém, este tipo de diagnóstico, é inadequado para identificação rápida do caso, uma vez que requer análises de soros emparelhados para alcançar sensibilidade suficiente, além de ser trabalhoso e subjetivo (FLANNERY et al., 2001). Com isso, vários esforços vêm sendo feitos para desenvolver novos testes sensíveis e específicos para a leptospirose, como testes rápidos baseados em antígenos recombinantes da bactéria (YAN et al., 2013).

Como forma de tratamento para a doença, são administrados antibióticos. (CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2013).

As vacinas contra a leptospirose consistem em células inteiras inativadas (bacterinas). No entanto, vários problemas associados com essas vacinas vêm sendo descritos, incluindo reações adversas (dor, náuseas, febre), imunidade de curta duração e proteção sorovar-específica. Com as desvantagens do uso das bacterinas como vacinas, há necessidade de novas estratégias vacinais para a prevenção da leptospirose. Conseqüentemente, vários estudos investiram na obtenção e avaliação de antígenos recombinantes de *Leptospira*, conservados em diferentes sorovares, buscando a indução de imunidade protetora contra a doença (DELLAGOSTIN et al., 2011).

2.5 Antígenos alvo de *Leptospira*

2.5.1 LipL32

A LipL32, é uma lipoproteína de membrana externa de tamanho 32 kDa, altamente conservada entre leptospiros patogênicos. É a mais abundante proteína presente na membrana externa das leptospiros (HAAKE et al, 2000). Verificou-se ser expressa nos túbulos proximais de animais infectados (BOONYOD et al., 2005). Estudos demonstraram que hamsters imunizados com BCG recombinante (rBCG) expressando LipL32 foram protegidos ($P \leq 0,05$) frente ao desafio com *L. interrogans Copenhageni* (SEIXAS et al., 2007). Além disso, outro estudo demonstra que a proteína recombinante coadministrada com o adjuvante rLTB protegeu 87% dos animais contra a leptospirose, tendo portanto, significativa proteção. Com isso, a LipL32 continua a ser a proteína mais promissora como candidato a vacina recombinante (GRASSMANN et al., 2012).

2.5.2 OmpL37

OmpL37 é uma proteína de membrana externa de 37 kDa conservada entre diferentes sorovares patogênicos da bactéria. Estudos demonstram que a proteína OmpL37 não foi detectada em nenhuma cepa saprófita investigada, com exceção da *Leptonema illini*, onde uma banda muito fraca pode ser detectada. Por ser reconhecida pelo soro de humanos e animais infectados, demonstra ser uma proteína antigênica e, por estar exposta na superfície bacteriana, pode ser considerada de fácil acesso ao sistema imune. Além disso, alguns ensaios *in vitro* avaliaram sua capacidade de ligação aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro, demonstrando afinidade ao fibrinogênio, fibronectina e elastina (PINNE et al., 2009). Outros experimentos demonstraram que a administração da OmpL37 recombinante induz uma forte resposta de anticorpos IgG, e estimulam uma resposta inflamatória mediada por TNF- α (OLIVEIRA et al., 2015).

2.5.3 LigANI, LigBNI e LigBrep

As proteínas LigA, LigB e LigC são antígenos encontrados nas leptospiros, denominados “*Leptospiral immunoglobulin-like (Lig)*”, e encontradas somente em cepas patogênicas. Estudos confirmaram que as proteínas Lig estão localizadas na superfície das leptospiros (MATSUNAGA et al., 2003). Outra descoberta importante é que todas as três proteínas Lig possuem domínios encontrados em proteínas que são fatores de virulência em microrganismos conhecidos. Recentemente, foi demonstrado que as proteínas Lig são adesinas (CHOY et al., 2007) e que a expressão delas é fortemente regulada pela osmolaridade (MATSUNAGA et al., 2005). Estudos demonstraram que tanto LigA quanto LigB são capazes de ligarem-se a componentes da matriz extracelular e fibrinogênio, possivelmente estando envolvidas na interação com o hospedeiro. A diversidade de ligantes relatados à família Lig poderiam, então, estar relacionadas a diferentes estágios da patogênese, os quais incluem processos críticos de adesão (CHOY et al., 2007)

A LigA é uma proteína de membrana externa de 130 kDa. A parte inicial, de seis domínios N-terminais, é idêntica aos domínios presentes na proteína LigB, sendo esta porção conhecida por LigBrep, de tamanho 54 kDa. A segunda parte, composta de seis domínios C-terminais é única (KOIZUMI; WATANABE, 2004), dando origem ao termo LigANI (não-idêntica), com tamanho 63 kDa (SILVA et al., 2007). Já a proteína LigBNI, de tamanho 66 kDa, é um fragmento do antígeno LigB, não-idêntico em LigA (SILVA et al., 2007). Estudos demonstram que uma estratégia vacinal contendo o fragmento recombinante LigANI conferiu proteção contra o desafio letal com 10^3 DL50 *leptospira*. Esta Proteção conferida pela LigANI variou de 67 a 100% em seis experimentos em que foram utilizados quatro lotes diferentes de proteína recombinante (SILVA et al., 2007). Em relação a proteína LigB, resultados demonstram que a imunização com LigB produziu fortes

respostas imunes humorais como revelado por títulos elevados contra cada fragmento, juntamente com a melhoria significativa de citocinas. A rLigB foi capaz de conferir uma proteção de 71% dos animais contra leptospirose (YAN et al., 2009). Também já foi demonstrado que a proteína LigBrep recombinante induz significativa resposta imune humoral e que animais imunizados com pTARGET/LigBrep, seguido de um desafio heterólogo, foram significativamente protegidos (62,5%) (FORSTER et al., 2013).

2.5.4 ErpY-like

O antígeno ErpY-like é uma proteína de *L. interrogans* até então pouco estudada, e que ainda não teve seu potencial imunoprotetor determinado. Trata-se de uma lipoproteína hipotética que possui sequência muito similar a fatores de virulência encontrados em outros patógenos (ESHGHI et al., 2009). Além disso, também foi descrita a presença do gene *erpY-like* em diferentes espécies patogênicas de *Leptospira*, estando ausente em uma espécie saprófita, o que sugere que essa proteína tenha importância no processo de infecção e potencial para ser utilizada como antígeno vacinal (LUCAS et al., 2010). Alguns dados já foram obtidos pelo nosso grupo de pesquisa com relação a capacidade imunoprotetora desta proteína, porém ainda não foram publicados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a estabilidade de plasmídeos contendo genes que codificam para seis diferentes proteínas de *Leptospira interrogans*, bem como a toxicidade destas proteínas em duas diferentes cepas de *Escherichia coli*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade das proteínas recombinantes LipL32, LigANI, LigBNI, ErpY-like, LigBrep e OmpL37 nas cepas de *E. coli* BL21 Star (DE3) e C43 (DE3);
- Avaliar o crescimento celular das cepas de *E. coli* BL21 Star (DE3) e C43 (DE3), transformadas com os plasmídeos clonados com os seis diferentes genes;
- Determinar a estabilidade de um conjunto de plasmídeos clonados com genes que codificam para as proteínas recombinantes LipL32, LigANI, LigBNI, ErpY-like, LigBrep e OmpL37 de *L. interrogans*, utilizando as cepas de *E. coli* BL21 Star e C43 (DE3).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas e plasmídeos

As cepas utilizadas para as avaliações foram *E. Coli* C43 (DE3) (Lucigen) e *E. Coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen). Essas cepas foram cultivadas a 37°C em caldo Luria-Bertani (LB) (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl) sob agitação de 170 rpm ou acrescido de 1,5% de ágar e, quando necessário, suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina. Todos os plasmídeos já clonados com os genes que codificam para as diferentes proteínas avaliadas neste trabalho, foram obtidos pelo Laboratório de Vacinologia da Universidade Federal de Pelotas.

4.2 Transformação das cepas de *E. Coli*

As transformações das cepas utilizadas nesse trabalho foram feitas através de choque térmico utilizando cloreto de cálcio (SAMBROOK, 2001). Foram adicionados em um tubo de 1,5 ml: 1 µL do vetor contendo o gene de interesse (pAE/*ompL37*, pAE/*erpY-like*, pAE/*lipL32*, pET/*ligANI*, pET/*ligBNI* e pET/*ligBrep*), 100 µl de cloreto de cálcio (100 mM) e 1 colônia isolada de *E. coli*. As misturas foram mantidas em gelo por aproximadamente 15 min e, então, submetidas a choque térmico à 42°C por 1 min, voltando ao banho de gelo por mais 5 min. Em seguida foram adicionados 500 µL de caldo LB às suspensões de células e estas foram mantidas por 1 h à 37°C, sob agitação (170 rpm). Após esse período, as suspensões foram plaqueadas em ágar LB contendo o antibiótico ampicilina.

4.3 Testes de toxicidade

Os efeitos tóxicos da expressão das proteínas heterólogas LigANI, LigBNI, LigBrep, LipL32, OmpL37 e ErpY-like, nas cepas de *E. coli* BL21 Star (DE3) e C43 (DE3), foram testados em dois conjuntos de placas contendo ágar LB,

acrescido de ampicilina, com a adição ou não de 1 mM isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) segundo protocolo descrito por Dumon-Seignovert et al, 2004. Foram consideradas tóxicas aquelas proteínas recombinantes em que não houve crescimento de colônias em placas contendo ampicilina e o indutor IPTG, comparado com o crescimento de colônias nas placas contendo apenas ampicilina. Esse ensaio foi realizado em duplicata para cada uma das cepas avaliadas.

4.4 Testes de estabilidade

A estabilidade dos plasmídeos foi verificada em ambas as cepas de *E. coli* utilizadas neste estudo, segundo protocolo descrito por Dumon-Seignovert et al, 2004. Uma única colônia recombinante representativa de cada um dos seis plasmídeos foi utilizada para inocular 2 ml de caldo LB-ampicilina e este cultivo mantido 16-18 h a 37°C, sob agitação de 170 rpm. Deste cultivo, foram utilizados 100 μ L para inocular 10 ml de caldo LB-ampicilina e estas culturas mantidas a 37°C, 170 rpm, até atingirem a fase exponencial de crescimento bacteriano (DO_{600nm} 0,6-0,8). Neste momento, as culturas foram induzidas por adição de 0,5 mM de IPTG e mantidas por mais 3 h, sob as mesmas condições de cultivo. A cada 1h de indução, uma amostra foi coletada e diluições seriadas foram preparadas (1:10 à 1:10¹⁶). Para cada uma destas diluições, 20 μ L foram imediatamente plaqueados em placas de ágar LB acrescidas ou não de ampicilina. A estabilidade de cada um dos plasmídeos foi estabelecida como a razão entre o número de colônias crescidas nas placas contendo ampicilina, sobre o número de colônias crescidas nas placas sem ampicilina. Esse ensaio foi realizado em duplicata para cada uma das cepas avaliadas.

4.5 Avaliação da taxa de crescimento celular

Para a avaliação da taxa de crescimento, foi utilizado como modelo o protocolo descrito por Larentis et al, 2014. As cepas de *E. coli* BL21 Star (DE3) e

C43 (DE3) transformadas com os plasmídeos recombinantes, foram cultivadas em 10 ml de caldo LB a 37°C, 170 rpm. Deste cultivo, a cada 30 min foram retiradas amostras após a indução com 0,5 mM de IPTG (DO_{600nm} 0,6-0,8), através da medida da DO_{600} , para medir o crescimento celular. Como controle, foram utilizadas as cepas BL21 Star (DE3) e C43 (DE3) não transformadas. Esse ensaio foi realizado em duplicata para cada uma das cepas avaliadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testes de Toxicidade

Os resultados para o ensaio de toxicidade das proteínas recombinantes LigANI, LigBNI, LigBrep, LipL32, OmpL37 e ErpY-like nas duas cepas de *E. coli*, estão mostrados na Tabela 1. Para a cepa BL21 Star (DE3) todas as seis proteínas testadas apresentaram-se tóxicas, evidenciado pela ausência total de colônias nas placas contendo o indutor IPTG, enquanto que nas placas contendo apenas LB-ampicilina houve crescimento. Em contrapartida, para a cepa C43 (DE3) as proteínas não apresentaram-se tóxicas, visto que as placas de LB-ampicilina com IPTG apresentaram crescimento evidenciado de colônias.

Tabela 1: Análise da toxicidade das proteínas recombinantes LigANI, LigBNI, LigBrep, LipL32, OmpL37 e ErpY-like expressas nas cepas de *E. coli* BL21 Star e C43 (DE3).

	LipL32	OmpL37	ErpY-like	LigANI	LigBNI	LigBrep
C43 (DE3)	Não tóxica	Não tóxica	Não tóxica	Não tóxica	Não tóxica	Não tóxica
BL21 Star	Tóxica	Tóxica	Tóxica	Tóxica	Tóxica	Tóxica

A produção de proteínas heterólogas em *E. coli* apresenta dois grandes problemas: a formação de corpos de inclusão e a toxicidade associada com a indução da expressão da proteína alvo que, frequentemente, resulta em morte celular (HATTAB et al., 2014). Na cepa de *E. coli* BL21 (DE3) o gene alvo é transcrito a partir do vetor pela T7 RNA polimerase, cuja expressão está sob o controle do promotor lac UV5, induzido por IPTG. Esse sistema foi empregado com sucesso para a expressão de muitas proteínas globulares, mas em muitos outros casos houve toxicidade da proteína alvo e consequente queda na expressão (GEORGE et al., 1994; STUDIER et al., 1990). Um estudo demonstra que, surpreendentemente, nenhuma das células contendo os plasmídeos 'vazios' produziu colônias em placas na presença de IPTG, indicando que os próprios plasmídeos são intrinsecamente tóxicos para *E. coli* BL21 Star (DE3) (MIROUX et

al., 1996). Em contraste, nenhum dos plasmídeos de expressão 'vazios' são tóxicos para a cepa C43 (DE3), em que a produção de T7 RNA polimerase é dez vezes menor (WAGNER et al., 2008). Isso sugere que um primeiro nível de toxicidade ocorre no nível transcricional, quando a T7 RNA polimerase é produzida em excesso. A superprodução do RNA mensageiro alvo é tóxica para a célula, pois sobrecarrega a maquinaria de tradução à custa da síntese de proteínas que são essenciais para a célula (DONG et al., 1995). Um segundo nível de toxicidade ocorre quando a proteína alvo recruta, por exemplo, uma proteína de membrana, sobrecarregando o processo de dobramento em *E. coli* ou a maquinaria de inserção (WAGNER et al., 2007). No melhor cenário, as chaperonas reconhecem a proteína de membrana, mas não conseguem sincronizar sua inserção nas membranas da *E. coli*, porque a T7 RNA polimerase trabalha muito depressa. Consequentemente, somente uma parte da proteína de membrana alvo é inserida e dobrada nas membranas da *E. coli* que, o que, por sua vez, compromete a homeostase e também a síntese de ATP (HATTAB et al., 2014).

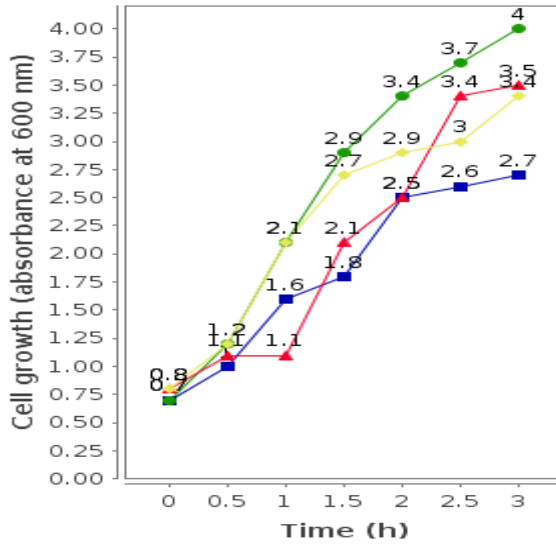
Diante disso, para minimizar os problemas de toxicidade, a cepa de *E. Coli* BL21 Star (DE3) foi melhorada. A cepa C43 (DE3) é derivada da cepa BL21 Star (DE3) e apresenta uma mutação que reduz o nível de atividade da T7 RNA polimerase, impedindo, assim, a morte celular associada com a superprodução de muitas proteínas recombinantes tóxicas (LUCIGEN). Nesse trabalho, observamos que a cepa C43 demonstrou ser melhor alternativa para expressão das proteínas de *Leptospira* avaliadas, quando comparada à BL21 Star, uma vez que menores níveis de toxicidade foram observados na mesma.

5.2 Taxa de crescimento celular

As medidas das absorbâncias que indicam os resultados do crescimento celular das cepas BL21 Star e C43 (DE3) transformadas com os plasmídeos recombinantes, estão resumidas na Figura 2.

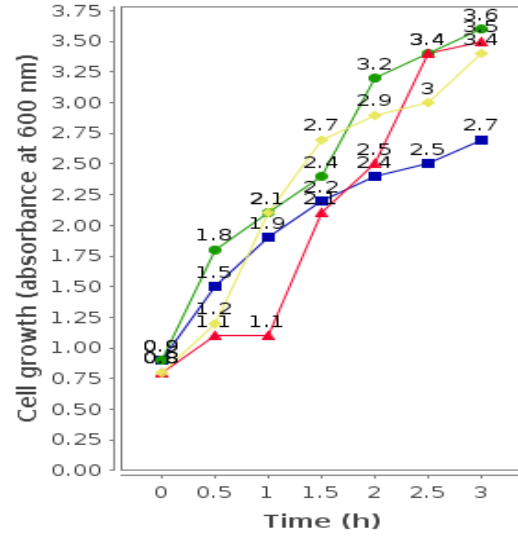
LigBrep

Generated by ChartGizmo.com



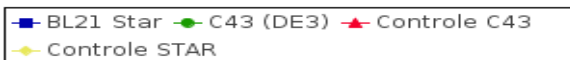
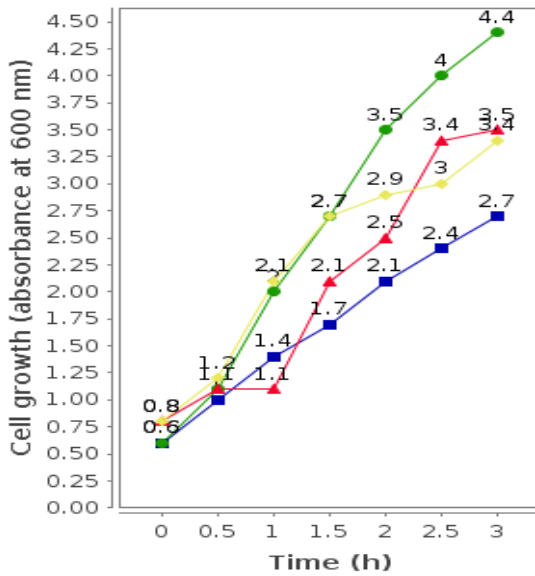
LigBNI

Generated by ChartGizmo.com



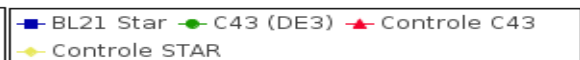
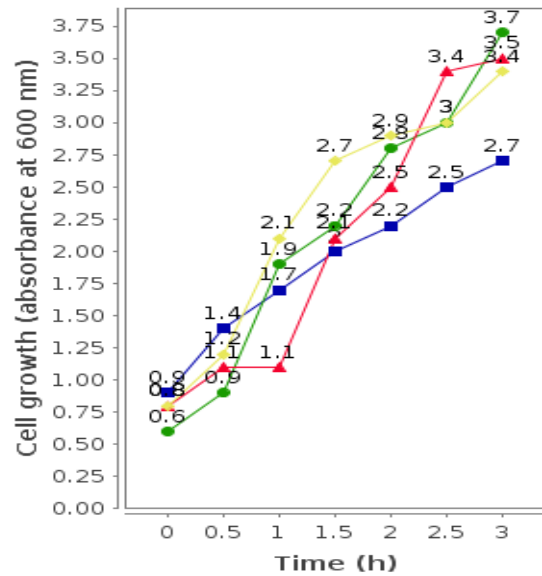
LipL32

Generated by ChartGizmo.com



OmpL37

Generated by ChartGizmo.com



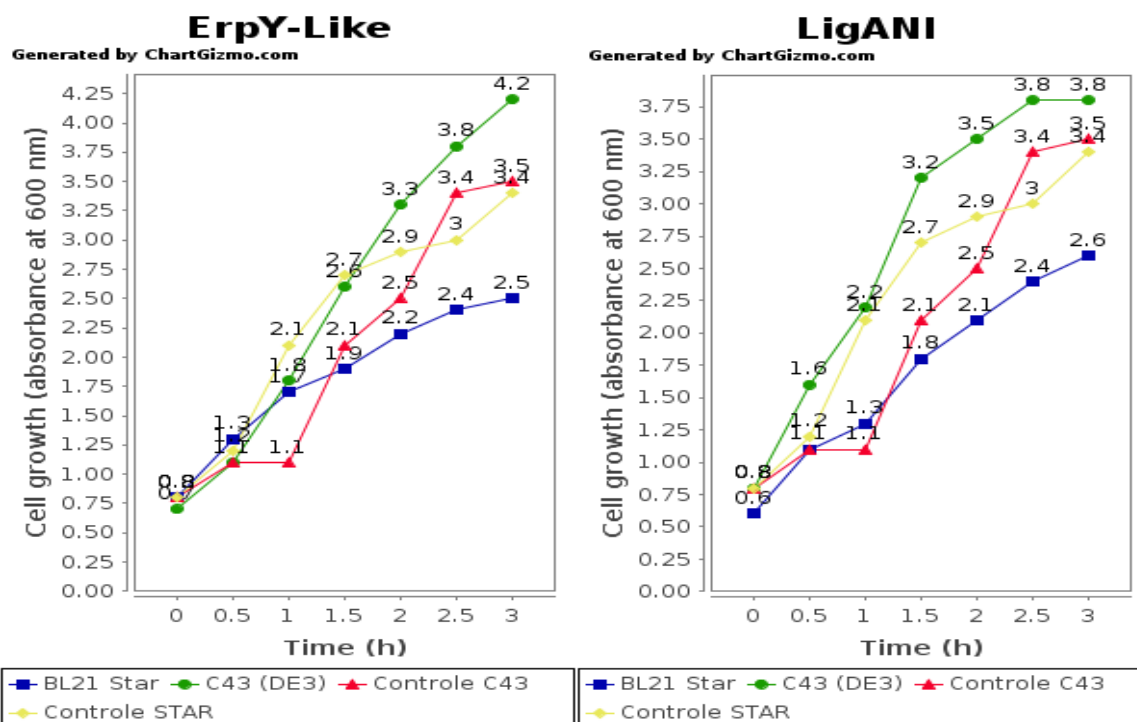


Figura 2: Curva de crescimento das cepas BL21 Star e C43 (DE3) transformadas com os plasmídeos recombinantes e induzidas com IPTG. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes.

Diante dos resultados mostrados na Figura 2, podemos observar que o crescimento celular na cepa C43 (DE3) foi consideravelmente maior em relação à cepa BL21 Star para todas as proteínas recombinantes avaliadas. Uma explicação para essa constatação é que, como vimos anteriormente, todas as proteínas recombinantes eram tóxicas para a cepa BL21 Star e não tóxicas para a cepa C43 (DE3). A toxicidade apresentada certamente ocasiona uma diminuição na taxa de crescimento celular, bem como, a perda do rendimento de expressão dessas proteínas. Como a cepa C43 (DE) é geneticamente modificada para possibilitar a expressão de antígenos tóxicos para a bactéria *E. Coli*, a taxa de crescimento celular é maior em relação às cepas que não possuem essa mutação.

Outro ponto importante a ser ressaltado é que, de acordo com a literatura, a redução da taxa de crescimento depois da indução pode ser causada pelo efeito tóxico do IPTG e/ou pela carga metabólica imposta sobre as células devido a expressão de proteínas heterólogas (LARENTIS et al., 2014). O nível de acúmulo

intracelular de uma proteína recombinante é proporcional ao crescimento celular final e à produtividade específica da proteína, com o nível de acúmulo tendo relação com a proteína total (LEE et al., 2006).

5.3 Testes de estabilidade

Para os testes de estabilidade dos plasmídeos que codificam para as proteínas recombinantes LigANI, LigBNI, LigBrep, OmpL37, LipL32 e ErpY-like, foi definida a razão entre o número de colônias em placas de ágar LB-ampicilina e o número de colônias em placas de ágar LB sem adição de ampicilina. Os resultados estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2: Avaliação da estabilidade dos plasmídeos recombinantes nas cepas de *E. coli* C43 (DE3) e BL21 Star.

	LipL32	OmpL37	ErpY-like	LigANI	LigBNI	LigBrep
C43 (DE3)	18,5%	100%	19,5%	76,5%	100%	100%
BL21 Star	5,5%	0%	0%	7%	0%	5,3%

A porcentagem da estabilidade dos plasmídeos corresponde a: [(Número de colônias em placas de ágar LB-ampicilina/número de colônias em placas de ágar LB sem ampicilina) X 100]. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes.

De acordo com a tabela, podemos observar que todos os plasmídeos são consideravelmente mais estáveis na cepa C43(DE3) do que na cepa BL21 Star. Esse fato pode ser compreendido através dos resultados obtidos anteriormente neste trabalho, onde é evidente a toxicidade dessas proteínas para a bactéria e pela baixa taxa de crescimento celular na cepa BL21 Star do que em relação à cepa C43(DE3).

Conforme a literatura, a estabilidade de um plasmídeo pode ser definida como a capacidade das células transformadas manterem um plasmídeo de múltiplas cópias inalterado durante o crescimento celular, manifestando as suas características fenotípicas (CAUNT et al, 1988). Vários fatores influenciam a instabilidade de um plasmídeo, e incluem a instabilidade estrutural do plasmídeo

em si, como: a segregação do plasmídeo para as células filhas durante a divisão celular, as consequências fisiológicas devido à expressão do gene pelo plasmídeo e a origem e tamanho do DNA exógeno. Estresses ambientais também são reportados por desempenharem papel importante na estabilidade do plasmídeo, estando relacionados a esse fator: a taxa de crescimento da célula hospedeira, limitações nutricionais, concentração de oxigênio e de condições de cultivo, tais como a presença ou ausência da pressão de seleção, pH e temperatura. Essa combinação de fatores pode resultar em instabilidade plasmidial, tornando este um fator importante para a utilização de uma cepa recombinante particular, em produções em grande escala (CANAVAN, 1994; FAKRUDDIN et al., 2012). Duas causas principais de instabilidade plasmidial foram identificadas em células recombinantes. A instabilidade segregacional ocorre devido a uma falha em transmitir o DNA recombinante à célula progenitora, enquanto a instabilidade estrutural ocorre devido à mutação ou mudanças na estrutura do DNA plasmidial causadas por acontecimentos como a recombinação (CAUNT et al, 1988). Entre os vários fatores que influenciam a estabilidade do plasmídeo, o estresse ambiental seja talvez, o mais fácil de controlar e, portanto, servir como uma via para melhorar ou otimizar a estabilidade do plasmídeo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho descreve os resultados obtidos envolvendo a avaliação da estabilidade de um conjunto de plasmídeos contendo genes de *Leptospira interrogans* nas cepas BL21 Star e C43 (DE3), avaliação da toxicidade destes antígenos, bem como, a comparação do crescimento celular dos mesmos. Nossos resultados demonstram a importância da escolha da cepa para a expressão de proteínas heterólogas, visando estabelecer um sistema de expressão de melhor custo/benefício. Assim, torna-se viável a obtenção de antígenos recombinantes de *leptospira* a serem utilizados em novos testes de diagnóstico e composições vacinais. Através disso, pretendo dar seguimento neste trabalho, realizando outros experimentos, como a avaliação do rendimento e do controle da expressão destas proteínas nas duas diferentes cepas, em diversas condições de crescimento. Também será realizada a avaliação da composição de diferentes meios de expressão, visando otimizar a produção dessas proteínas recombinantes.

7. CONCLUSÕES

- Todas as seis proteínas recombinantes de *Leptospira* avaliadas neste trabalho foram tóxicas para a cepa de *E. coli* BL21 Star;
- Nenhuma das proteínas recombinantes avaliadas foram tóxicas para a cepa de *E. coli* C43 (DE3);
- Todos os plasmídeos que foram testados são consideravelmente mais estáveis na cepa C43(DE3) do que em relação a cepa BL21 Star;
- O crescimento celular da cepa C43 (DE3) transformada com os plasmídeos recombinantes foi consideravelmente maior do que da cepa BL21 Star para todas as proteínas heterólogas avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287–296, 2010.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2 ed. Singapore: McGrawHill, 1986.
- BALBÁS, P. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. **Molecular Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 251–267, 2001.
- BELLÃO, C. **Avaliação de fontes de carbono e condições de indução na expressão de canacistatina em *Escherichia coli* BL21 (DE3)**. 2006. 90f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências exatas e Tecnológicas, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.
- BHARTI, A. R. et al. Reviews Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 757–771, 2003.
- BLAIS, D. R.; ALTOSAAR, I. Human CD14 expressed in seeds of transgenic tobacco displays similar proteolytic resistance and bioactivity with its mammalian-produced counterpart. **Transgenic Research**, v. 15, n. 2, p. 151–164, 2006.
- BOONYOD, D. et al. LipL32, an outer membrane protein of *Leptospira*, as an antigen in a dipstick assay for diagnosis of leptospirosis. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 23, n. 2-3, p. 133–141, 2005.
- BRASILEIRO, A.C.M. CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. EmbrapaSPI/Embrapa-Cenargen, 1988.
- BROWN, Gregory G. **Molecular Cloning – Selected Applications in Medicine and Biology**. 1 ed. Croatia: InTech, 2011.
- BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA – uma introdução**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2003.
- BURNS, G. W. e BOTTINO, P. J. **Genética**. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1991.
- CANAVAN, Peter D. **Studies on the plasmid stability, plasmid copy number and endo (1,3)(1,4) β -glucanase production by free and alginate immobilised recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells**. 1994. Tese (Pós Doutorado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Biológicas, Dublin City University, Dublin, 1994. Disponível em: <http://doras.dcu.ie/18393/1/Peter_D_Canavan.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2015.

CANDEIAS, J. A. A engenharia genética. **Revista de Saúde Pública**, v. 25, n. 1, p. 3–10, 1991.

CASALI, N. *Escherichia coli* host strains. **Methods in molecular biology**. v. 235, n. 4, p. 27–48, 2003.

CAUNT, P.; IMPOOLSUP, A.; GREENFIELD, P. F. Stability of recombinant plasmids in yeast. **Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 173–192, 1988.

CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. **Leptospirosis**. Iowa: College of Veterinary Medicine, 2013. Disponível em <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leptospirosis.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2015.

CENTRE FOR DISEASE CONTROL. **Guidelines for the Prevention of Leptospirosis**. Vancouver: Communicable disease control, 2008. Disponível em: <<http://www.bccdc.ca/>>. Acesso em: 17 out. 2015.

CHOY, H. A. et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2441–2450, 2007.

CHOY, H. A. et al. The multifunctional LigB adhesin binds homeostatic proteins with potential roles in cutaneous infection by pathogenic *Leptospira interrogans*. **PLoS one**, v. 6, n. 2, p. e16879, 2011.

COLLARES, T. et al. Animais transgênicos biorreatores. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 31, n. 4, p. 462–478, 2007.

COSTA, F. et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 1–19, 2015.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23-52, Sep, 2000.

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

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines**. v. 7, n. 11, p. 1215–1224, 2011.

DEMAIN, A L. Molecular genetics and industrial microbiology -- 30 years of marriage. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 352–356, 2001.

DONG, H.; NILSSON, L.; KURLAND, C. G. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 6, p. 1497–1504, 1995.

DUMON-SEIGNOVERT, L.; CARIOT, G.; VUILLARD, L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: A comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). **Protein Expression and Purification**, v. 37, n. 1, p. 203–206, 2004.

ESHGHI, A. et al. Global proteome analysis of *Leptospira interrogans*. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 10, p. 4564–4578, 2009.

ETIEMME, J. **Bioquímica genética e biologia molecular**. 5. Ed. Porto Alegre: Santos Comércio e Importação Ltda, 2003.

FAKRUDDIN, M. et al. Critical Factors Affecting the Success of Cloning, Expression, and Mass Production of Enzymes by Recombinant *E. coli*. **ISRN Biotechnology**, v. 2013, n. 3, p. 1–7, 2013.

FLANNERY, B. et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3303–10, 2001.

FORSTER, K. M. et al. 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. et al. Immune Evasion by Pathogenic *Leptospira* Strains: The Secretion of Proteases that Directly Cleave Complement Proteins. **The Journal of infectious diseases**, p. 1–11, 2013.

GELISSEN, Gerd. Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems. Estados Unidos: Wiley-YCH, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/3527603670>>. Acesso em: 12 out. 2015.

GEORGE, J. W.; BROSH, R. M.; MATSON, S. W. A dominant negative allele of the *Escherichia coli* *uvrD* gene encoding DNA helicase II. A biochemical and genetic characterization. **Journal of molecular biology**, v. 235, n. 2, p. 424–435, 1994.

GLICK, B. R. Metabolic load and heterologous gene expression. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 2, p. 247–261, 1995.

GLICK, Bernard R. et al. **Molecular biotechnology : principles and applications of recombinant DNA**. 4 ed. Washington: ASM Press, 2010.

GRASSMANN, A. A. et al. 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.

GROOMS, D. L.; BOLIN, C. A. Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhoea virus and *Leptospira* spp. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 21, n. 2 SPEC. ISS., p. 463–472, 2005.

HARTWIG, D. D. et al. Mannosylated LigANI produced in *Pichia pastoris* protects hamsters against leptospirosis. **Current Microbiology**, v. 68, p. 524–530, 2014.

HARTWIG, D. D. et al. The use of halloysite clay and carboxyl-functionalised multi-walled carbon nanotubes for recombinant LipL32 antigen delivery enhanced the IgG response. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 134–137, 2015.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M. e ELLIS, W. A. Emergence, control and reemerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.4, p. 494-501. 2011.

HATTAB, G. et al. Membrane Protein Production in *Escherichia coli*: Overview and Protocols. In: **Membrane Proteins Production for Structural Analysis**. p. 87–106, 2014.

HAAKE, D. A. et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276–85, 2000.

HAUKAAS, Tonje H. **Development of Expression Systems and Cultivation Conditions for Production of Heterologous Proteins in *Pseudomonas***. Noruega: Instituto Norueguês de Tecnologia, 2011. Disponível em: <<http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:422938/FULLTEXT01.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2015.

HAWES, C., BOEVINK, P., and MOORE, I. **Green fluorescent protein in plants. In Protein Localisation by Fluorescence Microscopy—A Practical Approach**, Oxford: Oxford University Press, 2000.

HOUEBINE, L. M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. Comparative Immunology, **Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 2, p. 107–121, 2009.

HU, Y. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 4, p. 405–416, 2005.

INVITROGEN. **BL21 Star™(DE3) One Shot® BL21 Star™(DE3)pLysS One Shot® Chemically Competent Cells**. Califórnia: Life Technologies Corporation, 2010. Disponível em: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshotbl21star_man.pdf>. Acesso em: 25 out. 2015.

JACKSON, A. M. et al. Cell-free protein synthesis for proteomics. **Briefings in functional genomics & proteomics**, v. 2, n. 4, p. 308–319, 2004.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, n. 11-12, p. 1545–52, 2004.

LARENTIS, A. L. et al. Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. **BMC research notes**, v. 7, n. 1, p. 671, 2014.

LARSEN, Marianne W. **Expression of a lipase in prokaryote and eukaryote host systems allowing engineering**. 2009. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Royal Institute of Technology, School of Biotechnology, Stockholm, 2009. Disponível em: <<http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:236156/FULLTEXT01.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2015.

LEE, K.-M. et al. Sequential and simultaneous statistical optimization by dynamic design of experiment for peptide overexpression in recombinant *Escherichia coli*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 135, n. 1, p. 59–80, 2006.

LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends in biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 98–105, 1996.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., & COX. M. M. (1993). **Principles of Biochemistry**. 2 ed. New York, NY. Worth Publishers, 1993.

LEONHARTSBERGER, S. *E. coli* Expression System Efficiently Secretes recombinant Proteins into Culture Broth. **BioProcess International**, 2006.

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

LUCAS, C.; FAGUNDES, M.; HARTLEBEN, C.; DELLAGOSTIN, O.; COLLARES, T. e SEIXAS, F. Análise da presença dos genes *lic11966*, *lic13166* e *lic12575* em diferentes espécies de *Leptospira* spp. In: **XIX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UFPEL**, Pelotas, 2010.

LUCIGEN. **OverExpress™ Competent Cells**. Middleton: Lucigen Corporation, 2007. Disponível em: <http://wolfson.huji.ac.il/expression/procedures/bacterial/Lucigen'sC41_3.pdf>. Acesso em: 25 out. 2015.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 3, p. 512–538, 1996.

MATSUNAGA, J. et al. 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.

MATSUNAGA, J. et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular microbiology**, v. 49, n. 4, p. 929–45, 2003.

MILJKOVIC-SELIMOVIC, B. et al. Bacterial Plasmids. **Acta medica Medianae**. n. 47, p. 54–57, 2007.

MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **Journal of molecular biology**, v. 260, n. 3, p. 289–298, 1996.

MONTE, L. G. et al. Monoclonal antibodies against the leptospiral immunoglobulin-like proteins A and B conserved regions. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 34, n. 5, p. 441–6, 2011.

MULLIS, Kary B. **Recombinant DNA technology and molecular cloning**. Scientific American, 1990. Disponível em: <http://www.blackwellpublishing.com/allison/docs/sample_ch8.pdf>. Acessado em: 4 out. 2015.

NASCIMENTO, Alexandra A. C. et al. **Tecnologia do DNA recombinante**. Brasil, 2003. Disponível em: <http://rbp.fmrp.usp.br/sites/default/files/apostilatd_2005.pdf>. Acesso em: 4 out. 2015.

NOVAGEN. **Competent Cells**. Darmstadt: EMD Biosciences, Inc, 2004. Disponível em: <https://www.med.unc.edu/pharm/sondeklab/files/resource-files/manuels/novagen_competent_cells2>. Acesso em: 25 out. 2015.

OLIVEIRA, S. V. DE; LOURDES, M. DE; SIMÕES, N. Reservatórios animais da leptospirose : Uma revisão bibliográfica. **Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde**, v. 39, p. 9–20, 2013.

OLIVEIRA, T. L. et al. Evaluation of the *Leptospira interrogans* Outer Membrane Protein OmpL37 as a Vaccine Candidate. **Plos One**, v. 10, n. 11, p. e0142821, 2015.

PANDEY, R. **Microbiologia Veterinária, Perspectivas Clínicas e Moleculares**. Ed. Rocca. São Paulo. 214p, 1994.

PETRAKOVSKY, J. et al. Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries: Reported Outbreaks and Literature Review (2002–2014). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 10770–10789, 2014.

PETSCH, D.; ANSPACH, F. B. Endotoxin removal from protein solutions. **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 2-3, p. 97–119, 2000.

PIERCE, A. B. **Genética: Um Enfoque Conceitual**. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

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

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 10, p. 1265–1276, 2000.

RAI, M.; PADH, H. Expression systems for production of heterologous proteins. **Corrent Science**, v. 80, n. 9, p. 1121–1128, 2001.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 307, n. 1-2, p. 249–264, 2008.

SAIDA, F. et al. Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. **Current protein & peptide science**, v. 7, n. 1, p. 47–56, 2006.

SAMBROOK, J.; W RUSSELL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 999, 2001.

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

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

SODOYER, R. Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. **BioDrugs**. n. 18, p. 51-52, 2004.

STEVENS, R. C. Design of high-throughput of protein production for structural biology. **Structure**, v. 8, n. 072/1, p. R177–R185, 2000.

STREATFIELD, S. J. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. **Methods**, v. 38, n. September 2005, p. 150–157, 2006.

STUDIER, F. W. et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods in Enzymology**, v. 185, n. 1986, p. 60–89, 1990.

SUSSMAN, M. **Escherichia coli: Mechanisms of Virulence**, ed 1997. Cambridge: University Press, 1997.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 211–22, 2006.

VASCONCELLOS S. A. Detection of *Leptospira* in two free living populations of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. **International Leptospirosis Society Barbados**. p. 62, 2002.

VINCENTEELLI, R.; ROMIER, C. Expression in *Escherichia coli*: Becoming faster and more complex. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 3, p. 326–334, 2013.

YAN, W. et al. 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.

YAN, W. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay using a recombinant LigA fragment comprising repeat domains 4 to 7.5 as an antigen for diagnosis of equine leptospirosis. **Clinical and vaccine immunology** : CVI, v. 20, n. 8, p. 1143–9, 2013.

WAGNER, S. et al. Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 6, n. 9, p. 1527–1550, 2007.

WAGNER, S. et al. Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 38, p. 14371–14376, 2008.

WANG, Y. et al. Expression Systems and Species Used for Transgenic Animal Bioreactors. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

WATSON, James D. **Recombinant DNA**. 2 ed. New York: New York Scientific American Books, 1992.

WHO. **Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control**. United States: World Health Organization, 2003. Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/en/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf>. Acesso em: 18 out. 2015.

XU, M. et al. **Heterologous Gene Expression in E.coli**. In: *Methods in Molecular Biology*, v. 705 p. 295–307, 2011.