

Bárbara Nobre Lafeté

**Produção e caracterização da proteína recombinante LipL32 de
Leptospira spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo da Silva

Co-orientadores: Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann
Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins

**BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG**

2010

L162p Lafetá, Bárbara Nobre, 1979-
Produção e caracterização da proteína recombinante LipL32 de
Leptospira spp. / Bárbara Nobre Lafetá. – 2010.
45 p. : il.

Orientador: Nivaldo da Silva
Co-orientadores: Marcos Bryan Heinemann, Nelson Rodrigo da
Silva Martins
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola
de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Leptospirose em animais – Teses. 2. Proteínas da membrana -
Teses. 3. Proteínas – Eletroforese – Teses. I. Silva, Nivaldo da.
II. Heinemann, Marcos Bryan. Martins, Nelson Rodrigo da Silva.
IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
V. Título.

CDD – 636.089 692

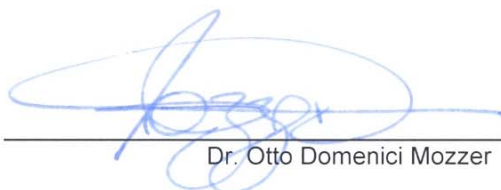
Dissertação defendida e aprovada em 28 de maio de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Nivaldo da Silva
Orientador



Dr.ª. Maria Rosa Quaresma Bonfim



Dr. Otto Domenici Mozzer



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis



Dr.ª. Anna Monteiro Correia Lima-Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, minha avó e meus irmãos por sempre me apoiarem sem questionarem as minhas escolhas.

Ao meu marido Felipe pela ajuda, apoio e disponibilidade em fazer da sua vida a nossa vida.

A minha filha Vitória por ter trazido alegria para o meu coração mesmo quando, no laboratório, as coisas não iam bem.

Ao meu orientador, Prof. Nivaldo, pela sua sabedoria ao conduzir meu processo de formação, pela amizade e pela compreensão demonstrada diante das situações inesperadas.

A VALLÉE S/A pelo financiamento deste projeto e de minha bolsa de estudo.

Ao Dr. Otto Mozzer pelo empenho em unir Universidades e empresas privadas beneficiando ambas as instituições e os alunos envolvidos neste processo.

A equipe do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva desta Escola pela ajuda e companheirismo durante todo este trabalho.

Aos amigos Toninho e Nádia pela grande ajuda que me ofereceram durante a execução deste trabalho.

Aos colegas que me apoiaram ao longo dos quatro anos deste curso.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	12
2.1. Considerações gerais	12
2.2. Classificação	13
2.2.1. Classificação sorológica.....	13
2.2.2. Classificação genotípica	14
2.3. Resposta imune à <i>Leptospira</i> spp.	15
2.3.1. Infecção.....	15
2.4. Biologia molecular das leptospiros	15
2.5. Proteínas de Membrana.....	15
2.6. Perfil eletroforético e imunoreatividade das proteínas de membrana exte <i>Leptospira</i> spp.....	16
2.7. Características gerais da LipL32.....	17
2.8. O gene LipL32.....	18
2.9. Características estruturais da proteína LipL32	18
2.10. Utilização da LipL32.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Etapa I- Escolha do antígeno.....	19
3.1.1. Amostra.....	19
3.1.2. Local de realização dos experimentos.....	19
3.1.3. Cultivo das amostras.....	19
3.1.4. Coleta e armazenamento dos soros utilizados nos testes de Western blot	20
3.1.5. Extração de proteínas da membrana externa.....	20
3.1.6. Precipitação protéica com acetona	22
3.1.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida realizada com proteínas de membrana externada <i>Leptospira</i> spp. sob condições desnaturantes	22
3.1.8. Coloração do gel com nitrato prata	22
3.1.9. Análise por Western blot	22
3.2. Etapa II - Clonagem e subclonagem do gene LipL32.....	23
3.2.1. Amostras Utilizadas	23
3.2.2. Local de realização dos experimentos.....	23
3.2.3. Meios e condições de cultivo	23
3.2.4. Gene.....	23
3.2.5. Plasmídeo	23
3.2.6. Iniciadores	23
3.2.7. Clonagem do gene LipL32 no vetor pet 21 ^a	24
3.2.8. Sequencia de aminoácidos esperada.....	25
3.2.9. Extração do DNA genômico da <i>Leptospira</i>	25
3.2.10. Reação em Cadeia da Polimerase	25
3.2.11. Visualização dos produtos da PCR	25
3.2.12. Clonagem em vetor de propagação.....	25
3.2.13. Transformação	25
3.2.14. Cultivo das células transformadas	25
3.2.15. Seleção dos clones positivos contendo o inserto – PCR de colônia	25
3.2.16. Purificação de banda de gel.....	26

3.2.17.	Estimativa do DNA purificado	26
3.2.18.	Reação de seqüenciamento	26
3.2.19.	Análise dos seqüenciamentos	26
3.2.20.	Extração de plasmídeos.....	27
3.2.21.	Digestão enzimática.....	27
3.2.22.	Purificação dos fragmentos de interesse.....	27
3.2.23.	Reação de ligação	27
3.2.24.	Transfecção do pet 21A em células de propagação	27
3.2.25.	Testando as UFCs resultantes da transformação com pet 21 ^a	27
3.2.26.	Teste de restrição dos clones positivos na PCR	27
3.2.27.	Sequenciamento dos clones selecionados.....	28
3.2.28.	Testes de expressão.....	28
3.2.28.1.	Cultivo das amostras de <i>E. coli</i> transformadas.....	28
3.2.28.2.	Quanto à linhagem celular utilizada e à UFC	28
3.2.28.3.	Concentração de IPTG utilizada para indução	28
3.2.28.4.	Temperatura.....	28
3.2.29.	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	28
3.2.30.	Verificação da expressão após purificação do lisado da <i>E. coli</i>	29
3.3.	Etapa III - Planejamento da síntese do gene LipL32 no plasmídeo pJexpress 404	29
3.3.1.	Planejamento da expressão do gene que codifica a proteína LipL32 madura	29
3.3.2.	Experimento de propagação	29
3.3.3.	Transformação das Células de expressão	29
3.3.4.	Testes de expressão.....	29
3.3.5.	Purificação da LipL32.....	29
3.4.	Etapa IV- Testes com a proteína LipL32	30
3.4.1.	Produção de soro hiperimune em coelhos	30
3.4.2.	Western blot com extrato total de <i>E. coli</i> com soro de coelho.....	30
3.4.3.	Soros de bovinos naturalmente infectados.....	31
3.4.4.	Western blot com soros de bovinos realizados com LipL32 purificada.....	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1.	Etapa I - Escolha do antígeno.....	31
4.1.1.	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes.....	31
4.1.2.	Teste de Western blot com proteínas das membranas externas das amostras Hardjobovis, Wolffi, Icterohaemorrhagiae e Pomona	32
4.2.	Etapa II - Clonagem e subclonagem do gene LipL32 da <i>L. interrogans</i> sorovariedade Hardjo subtipo hardjoprajitno	35
4.2.1.	Análises dos seqüenciamentos.....	35
4.3.	Etapa III - Planejamento da síntese do gene sintético LipL32 no plasmídeo pJexpress 404	36
4.3.1.	Sequenciamento do gene LipL32	37
4.3.2.	Transformação e testes de expressão.....	38
4.3.3.	Purificação.....	39
4.4.	Etapa IV - Testes com a LipL32.....	40
4.4.1.	Western blot com lisado de <i>E. coli</i> - Soro de coelho	40
4.4.2.	Testes de Western blots realizados com LipL32 recombinante purificada e com soro de bovinos	41
5.	CONCLUSÕES	43
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sorogrupos e algumas sorovariedades de <i>Leptospira interrogans</i> lato sensu.....	13
Tabela 2	Genomospecies de leptospiros associadas aos sorogrupos, segundo a classificação genotípica.	14
Tabela 3	Localização na membrana e exposição na superfície de lipoproteínas de <i>Leptospira interrogans</i>	17
Tabela 4	Massas moleculares das proteínas observadas nas sorovariedades Hardjobovis, Wolffi, Icterohaemorrhagiae e Pomona.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da extração da membrana externa da <i>L. interrogans</i>	21
Figura 2	Sequência requerida	29
Figura 3	Gel unidimensional – SDS-PAGE, corado com nitrato de prata das proteínas de membrana externa da <i>L. interrogans</i>	32
Figura 4	Testes de Western blot realizados com a <i>L. interrogans</i> sorovariedades Hardjobovis; Icterohaemorrhagiae; Pomona e Wolffi	33
Figura 5	Resultados dos sequenciamentos do sítio de multiclonagem do plasmídeo pet 21 ^a	36
Figura 6	Código Genético responsável pela síntese da proteína LipL32 em <i>Leptospira</i> spp.....	37
Figura 7	Sequência otimizada e sua tradução.....	38
Figura 8	LipL32 purificada.....	39
Figura 9	Western blot realizado com proteínas do extrato total de <i>E. coli</i> induzida e não induzida	40
Figura 10	Western blot realizado com a proteína LipL32 purificada.....	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Iniciadores utilizados.....	24
Quadro 2	Padronização 1 utilizado na amplificação do gene da LipL32 por meio da PCR .	25
Quadro 3	Padronização 2 utilizado na amplificação do gene da LipL32 inserido no vetor TOPO TA por meio da PCR.....	26
Quadro 4	Reações de ligação do inserto – gene LipL32 – no vetor de expressão pet 21A	27

LISTA DE ABREVIATURAS

AMR	Aglutinação Microscópica Rápida
LPS	Lipopolissacarídeo
KDa	Kilo Daltons
OMS	Organização Mundial de Saúde
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphato Polyacrilamide

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil das proteínas da membrana externa (PMEs) da *Leptospira interrogans* sorovariedades Hardjobovis, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Wolffi; produzir e testar a proteína LipL32 frente ao soro de animais naturalmente infectados. Foram utilizadas técnicas de extração da membrana externa com Triton X114 e precipitação das proteínas com acetona, clonagem e subclonagem do gene LipL32, otimização do gene LipL32 para códons próprios da *E. coli*, construção do gene LipL32 de forma sintética, produção da proteína LipL32 e testes Western blot com a proteína recombinante LipL32. Na eletroforese com gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes as bandas de massa molecular iguais a 22, 29, 32, 36, 41 e 48 KDa apresentaram-se como os principais componentes das PME das quatro sorovariedades testadas. Nos testes de Western blot as bandas com massas moleculares iguais a de 22, 29, 32, 41, 48, 52 e 75 KDa reagiram em todas as sorovariedades testadas. A expressão do gene sintético LipL32 foi realizada com sucesso, porém não foram obtidos níveis de expressão satisfatórios. A proteína LipL32 recombinante foi reagente em todos os testes de Western blot realizados.

Palavras-chave: *Leptospira interrogans* Hardjobovis, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* e *Wolffi*, proteínas de membrana, LipL32.

ABSTRACT

This work aimed to study the profile of outer membrane proteins (OMPs) of *Leptospira interrogans* serovars Hardjobovis, Icterohaemorrhagiae, Pomona and Wolffi, express a sintetic gene LipL32 and test the LipL32 protein front of serum from naturally infected bovine. Techniques were used to extract the outer membrane with Triton X114 and precipitation with acetone, cloning and subcloning of the gene LipL32, optimization of the LipL32 gene for expression in *E. coli*, construction of the LipL32 synthetic gene, expression and testing of the LipL32 protein in Western blot. In SDS-PAGE bands of molecular mass to 22, 29, 32, 36, 41 and 48 kDa proved to be the major components of outer membrane proteins of the four serovars tested. In the Western blot bands with molecular mass to 22, 29, 32, 41, 48, 52 and 75 kDa reacted in all the serovars tested. The LipL32 protein expression from synthetic gen was successful but did not achieve high levels of expression. Protein LipL32 was reactive in all Western blot tests performed.

Keywords: *Leptospira interrogans* Hardjobovis, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* and *Wolff*, membrane protein, LipL32.

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma importante zoonose disseminada por todo o mundo, responsável por grandes perdas econômicas na pecuária. Esta doença é causada por uma enorme diversidade de sorovariedades de leptospiros, sendo que mais de 250 leptospiros patogênicos já estão descritas. Felizmente, essas sorovariedades não coabitam os mesmos ambientes, de maneira que cada região e cada espécie animal possuem um perfil de prevalência para uma determinada época. No caso dos rebanhos bovinos no Brasil, a prevalência da sorovariedade Hardjo tem sido conhecida nas últimas duas décadas através dos resultados dos estudos de soroprevalência. Além desta sorovariedade, os resultados destes trabalhos constatarem a presença, com menor prevalência, de outras sorovariedades. Consequentemente há um amplo espectro de sorovariedades prováveis de acometerem um rebanho o que requer uma cobertura vacinal ampla o suficiente para prevenir a leptospirose proveniente de qualquer uma das sorovariedades mais prováveis.

As vacinas anti-leptospirose comercializadas em várias partes do mundo possuem normalmente cinco ou seis sorovariedades de *Leptospira interrogans* pertencentes a diferentes sorogrupos. A estratégia utilizada nestas vacinas visa proteger os bovinos das sorovariedades contidas na vacina e de sorovariedades pertencentes aos sorogrupos dos quais elas fazem parte. Isto só é possível porque ocorrem reações cruzadas quando as infecções são provocadas por sorovariedades pertencentes ao mesmo sorogrupo. Porém, sabe-se que este modelo de vacina está muito susceptível a falhas, principalmente no que diz respeito à forma crônica da leptospirose. Estas falhas vacinais podem ser provocadas pela ausência de alguma sorovariedade prevalente naquela região na composição da vacina utilizada; pela vacina conferir proteção por um período de tempo inferior ao esperado ou ainda por má conservação dos antígenos da membrana externa das

células de *Leptospira* utilizadas na formulação das vacinas. Diante desse quadro, pecuaristas e fabricantes de vacinas têm buscado soluções diversas para conseguirem prevenir a leptospirose de forma efetiva. Alguns pecuaristas buscam vacinas específicas para seus rebanhos, formuladas após a determinação das sorovariedades prevalentes no mesmo. Enquanto os fabricantes buscam vacinas de amplo espectro que se baseiam em antígenos comuns às tantas sorovariedades existentes. Vacinas que sejam capazes de proteger os rebanhos por períodos maiores e que sejam eficazes em qualquer região.

Para tal, as principais sorovariedades de *Leptospira interrogans* vem sendo estudadas. Algumas sorovariedades de *Leptospira* tiveram seu código genético seqüenciado e algumas já tiveram suas proteínas testadas frente a soros de animais naturalmente infectados. Os avanços obtidos até agora ainda não foram suficientes para se estabelecer uma nova estratégia na formulação de vacinas de subunidade que capazes de conferir ampla e prolongada proteção aos rebanhos. Mas as tentativas são necessárias e úteis ao processo de formação do conhecimento. Este trabalho é mais uma contribuição da ciência neste sentido.

Os objetivos deste trabalho foram comparar os perfis protéicos das membranas externas de quatro sorovariedades de *L. interrogans*, Wolffi, Icterohaemorrhagiae, Hardjobovis e Pomona; expressar e testar a proteína LipL32 frente ao soro de animais hiperimunizados e naturalmente infectados.

2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

2.1. Considerações gerais

As leptospiros são microrganismos aeróbios obrigatórios, pertencentes ao gênero *Leptospira*, ordem *spirochaetales*, família *leptospiraceae*. Podem viver livres no ambiente as quais são denominadas leptospiros saprófitas, ou parasitando animais domésticos, silvestres e o próprio

homem sendo estas denominadas leptospiros patogênicas. Sua célula é helicoidal, medindo de 6 a 20 µm de comprimento e 0,1 µm de diâmetro. São Gram-negativas apesar de não se corarem apropriadamente com corantes a base de anilina. São visualizadas com condensador de campo escuro ou em microscópio de contraste de fases. Nesses casos, são visualizadas vivas em meio líquido e podem ter sua motilidade associada à sua viabilidade. Após serem coradas com prata podem ser visualizadas em microscópio de campo claro. Como são microrganismos fastidiosos, necessitam de meios enriquecidos, crescem em meios líquidos ou semi-sólidos a temperatura de 29°C. A manutenção das culturas pode ser feita em meios semi-sólidos por até três meses; por congelamento em nitrogênio líquido e estocagem em ultra-freezer a -96°C ou por liofilização (Krieg, 1984). Enquanto a manutenção da virulência das culturas deve ser feita com passagens periódicas dos organismos em hospedeiros (Faine et al., 1999).

2.2. Classificação

2.2.1. Classificação sorológica

O gênero *Leptospira* possui dois sistemas vigentes de classificação. No sistema convencional, todas as leptospiros patogênicas pertencem à espécie *Leptospira interrogans* e todas as amostras não patogênicas pertencem à espécie *L. biflexa*. Com base em critérios sorológicos, as leptospiros são diferenciadas em sorovariedades, definidas como os representantes básicos do táxon. As sorovariedades que possuem semelhanças antigênicas são agrupadas dentro de um mesmo sorogrupo (Tab. 1). Os sorogrupos não possuem status taxonômico oficial, mas possuem importância clínica e epidemiológica. A lista de sorovariedades é atualizada periodicamente e já conta com mais de 250 sorovariedades leptospiros patogênicas distribuídas em 26 sorogrupos (Valverde et al., 2008).

Tabela 1. Sorogrupos e algumas sorovariedades de *Leptospira interrogans lato sensu*.

Sorogrupos	Sorovariedades
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai, Zimbabwe
Hedomadis	Hebdomadis, Jules, Kremastos
Autumnalis	Autumnalis, Fortbragg, Bim, Weeransinghe
Pyrogenes	Pyrogenes
Bataviae	Bataviae
Grippotyphosa	Grippotyphosa, Canalzonae, Rratnapura
Canicola	Canicola
Australis	Australis, Bratislava, Lora
Pomona	Pomona
Javanica	Javanica
Sejroe	Sejroe, Saxkoebing, Hardjo
Panamá	Panamá, Mangus
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Sarmin	Sarmin
Mini	Mini, Geórgia
Tarassovi	Tarassovi
Ballum	Ballum, aroberea
Celledoni	Celledoni
Louisiana	Louisiana, lanka
Ranarum	Ranarum
Manhao	Manhao
Shermani	Shermani
Hurstbridge	Hurstbridge

2.2.2. Classificação genotípica

Segundo a classificação genotípica, baseada em homologia de DNA, estão descritas 17 espécies de *Leptospira* (Tabela 2) que reúnem variedades patogênicas, saprófitas e aquelas que ainda causam dúvidas quanto a sua forma de manutenção no ambiente. A relação entre as duas classificações ainda é pobre e ambígua (Valverde et al., 2008). Para os

microbiologistas a classificação molecular ainda é bem problemática por causa da clara incompatibilidade com o sistema de sorogrupos (Levett, 2001). As divergências entre as duas classificações mostram que, sorologicamente, a *L. interrogans* sorovariedade Hardjo pertence ao sorogrupo *sejroe* e genotipicamente à espécie *L. borgpetersenii* (Faine et al., 1999).

Tabela 2. Genomospécies de leptospiros associados aos sorogrupos, segundo a classificação genotípica.

Sorogrupos	Genomospécies
Andamana	<i>L. biflexa</i>
Australis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Autumnalis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Ballum	<i>L. borgpetersenii</i>
Bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Canicola	<i>L. interrogans</i> , <i>L. inadaí</i> , <i>L. kirschneri</i>
Códice	<i>L. wolbachii</i>
Cynopteri	<i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Djasiman	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Grippotyphosa	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Hebdomadis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. Kirschneri</i> , <i>L. weilli</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. alexanderi</i>
Hurstbridge	<i>L. fainei</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilli</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. inadaí</i>
Javanica	<i>L. weillii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. inadaí</i> , <i>L. alexanderi</i>
Lousiana	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>
Lyme	<i>L. inadaí</i>
Manhao	<i>L. weillii</i> , <i>L. inadaí</i> , <i>L. alexanderi</i>
Mini	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weillii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Panamá	<i>L. noguchii</i> , <i>L. inadaí</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. noguchii</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. weillii</i> , <i>L. borgpetersenii</i>
Ranarum	<i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i>
Sarmin	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weillii</i>
Sejroe	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. weillii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i>
Semarang	<i>L. meyeri</i> , <i>L. biflexa</i>
Shermani	<i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. inadaí</i>
Tarassovi	<i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weillii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. inadaí</i>

2.3. Resposta imune à *Leptospira* spp.

A imunidade atuante no processo de infecção parece ser por mecanismos humorais e está diretamente ligada às moléculas expostas na superfície celular, lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas de membrana externa (PME) (Faine et al., 1999). Enquanto os LPS são bastante variáveis entre as diversas sorovariedades e são responsáveis pela especificidade da imunidade, as PME são conservadas e possuem funções ligadas à adesão e à colonização (Ristow et al., 2007).

Os mecanismos de infecção independem da sorovariedade infectante. Ao contrário, o organismo hospedeiro pode ser mais ou menos susceptível à infecção ou às suas diferentes fases. Por exemplo, os ratos são portadores bem adaptados às sorovariedades *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni*, eles são resistentes à fase aguda da doença quando infectados por estas ou por outras sorovariedades de *Leptospira*. Por outro lado, estas mesmas sorovariedades são capazes causar o aparecimento de sinais clínicos característicos da fase aguda da leptospirose podendo até levar a morte animais de outras espécies (Faine et al., 1999).

2.3.1 Infecção

As leptospirosas invadem os organismos hospedeiros pela mucosa do trato genital ou da nasofaringe, por lesões na pele, pelos pulmões após a inalação de aerossóis contendo partículas infecciosas ou pela invasão da placenta em qualquer estágio da gestação. As amostras que possuem habilidade para sobreviverem às adversidades e se multiplicarem no organismo hospedeiro são consideradas virulentas. Não são piogênicas já que não causam fortes reações inflamatórias no tecido. A sua instalação no organismo hospedeiro depende de sua habilidade em driblar a imunidade inata. As imunoglobulinas agem juntamente com o sistema complemento e com lisozimas ligando-se à superfície da leptospira

causando sua lise. Desta forma, as amostras não patogênicas são susceptíveis à imunidade inata, assim como, aquelas amostras patogênicas que expressam PMEs compatíveis com os anticorpos não específicos responsáveis pelo âncoramento na superfície bacteriana das moléculas que desencadeiam os processos de lise celular. Já as leptospirosas virulentas são resistentes a esta primeira investida do sistema imune do hospedeiro não expressando receptores que poderiam servir para o acoplamento das moléculas pertencentes ao sistema de lise da imunidade inata em sua superfície requerendo assim anticorpos específicos para seu combate (Faine et al., 1999). Além disto, as amostras virulentas expressam PME responsáveis por uma apropriada colonização. Por exemplo, amostras virulentas que tiveram o gene da PME *Loa22* silenciado tornaram-se incapazes de provocar a fase aguda da doença e lesões patológicas em tecidos nas espécies susceptíveis (Ristow et al., 2007).

2.4 Biologia molecular das leptospirosas

O genoma das leptospirosas tem um tamanho aproximado de 5.000 Kb (Kilobase), embora existam estimativas menores (Taylor et al., 1991). Estruturalmente, o genoma compreende uma parte de 4.400 Kb e outra de 350 Kb, ligadas ao cromossoma, não existindo outros plasmídeos descritos (Hyde e Johnson, 1984). Genes de 16S e 23S e rRNA ligados aos ribossomos são também descritos (Fukunaga e Mifuchi, 1989).

Numerosos outros genes pertencentes à *Leptospira* foram clonados e analisados, incluindo os que codificam ou regulam a síntese de aminoácidos, proteínas, RNA polimerase, proteínas de choque térmico, esfingomielinase, hemolisinas, proteínas de membrana, proteínas flagelares e síntese de lipopolissacarídeos, segundo descrito por Levett (2001).

2.5 Proteínas de Membrana

As leptospirosas possuem em comum com outras bactérias espiroquetas uma típica estrutura de membrana dupla, na qual a

membrana citoplasmática e a parede celular são fortemente associadas e cobertas por uma membrana externa (PME). Os lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa das leptospiros possuem composição similar aos LPS de outras bactérias Gram negativas; sua atividade endotóxica, porém, é considerada menor (Levett, 2001).

A membrana externa de bactérias espiroquetas é responsável pela interface entre a célula e o meio externo. Ela possui função de barreira seletiva, além de ser a primeira estrutura a entrar em contato com o sistema imune do hospedeiro. Durante a infecção, as leptospiros devem ser capazes de driblar o sistema imune do hospedeiro para efetuar uma apropriada colonização; moléculas associadas à membrana devem mediar esta interação entre o hospedeiro e o microrganismo (Cullen et al., 2004).

2.6 Perfil eletroforético e imunoreatividade das proteínas de membrana externa da *Leptospira* spp

Brown et al. (1991), estudando o perfil protéico de sorovarietades prevalentes de *Leptospira interrogans* (Hardjo, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Canicola) e utilizando soros de coelhos hiperimunizados incubados com lisado de células totais de *Leptospira*, observaram reação em relação às proteínas de 63, 42 e 21 KDa. Para as sorovarietades Hardjobovis, Balcânica e Hardjoprajitno observaram em todos os resultados a presença de proteínas de massas moleculares próximas a 25, 32 e 35 KDa. Entre todas as sorovarietades estudadas os autores observaram alto grau de reações cruzadas e, em SDS-PAGE, as bandas de 95, 60, 50, 42, 40, 38, 32 e 25 KDa se mostraram comuns, com diferenças quantitativas.

Em outro estudo realizado com lisado total das amostras *L. alstoni* sorovarietade Grippotyphosa, *L. borgpetersinii* sorovarietade Hardjobovis, e *L. interrogans* sorovarietades Autumnalis, Bratislava, Canicola, Icterohaemorrhagiae e Pomona foram observadas proteínas, por meio de

eletroforese unidimensional. As sorovarietades Hardjo e Pomona revelaram seis bandas de proteínas comuns, de massas moleculares aproximadas de 77, 55, 42, 35.5, 24 e 18 KDa. Já quando a técnica utilizada foi o Western blot realizado com soros de coelhos hiperimunizados foram observadas seis bandas comuns, de 66, 59.5, 44, 35.5 e 18 KDa, respectivamente (Nicholson e Prescott, 1993).

Biswas et al. (2005) estudaram as PME dos isolados D22, *moskva* V, AF61, CH 11, *Aut* N, e *patoc* I, pertencentes a cinco sorogrupos, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae*, *andamana*, *autumnalis* e *semaranga*. Os resultados sugerem que os principais componentes protéicos da membrana externa das seis amostras isoladas são proteínas com massas moleculares de 67, 41, 35, 32, 28 e 22 KDa. As PME de massas moleculares 67 e 32 KDa estão presentes nas membranas externa e interna, assim como no extrato de célula completa obtido com o uso de detergente. Nos testes de Western blot feitos com lisado de células completas as proteínas imunorreativas tinham massas moleculares iguais a 67, 65, 60, 45, 41 e 32 KDa, sendo que a proteína de massa molecular 32 KDa juntamente com a de 45 KDa foram imunodominantes nas seis amostras isoladas.

Matsunaga et al. (2006) correlacionam algumas características importantes sobre as proteínas das leptospiros, tais como massa molecular, localização na membrana, exposição na superfície e outros, com sua designação, o que pode auxiliar na elucidação dos resultados obtidos em estudos de PME a partir de SDS-PAGE (Tab. 3).

Analisando o perfil protéico das proteínas de membrana externa da *L. interrogans* sorovarietade Hardjo subtipo hardjoprajitno, através de eletroforese uni e bidimensional e testes de Western blot, Lafeté et al. (2009) concluíram que esta possui similaridade com as demais *Leptospiras* patogênicas, sem, contudo, se mostrar idêntica às mesmas. Encontraram como principal componente da membrana externa uma

proteína com massa molecular aparente de 22 KDa e as proteínas de membrana LipL32 e PME45 como aquelas capazes de induzir maior resposta humoral em animais naturalmente infectados. Foram ainda identificadas 14 bandas, sendo os maiores componentes representados pelas proteínas de 22 (LipL22), 29 (LipL32), 47 (LipL48) e 63 KDa. Ao testar as PME em Western blot frente a soros de coelhos hiperimunizados encontrou bandas de massas moleculares equivalentes a 36 KDa, 27 KDa, 24 KDa e 21 KDa como as que se coraram mais

intensamente. Utilizando o mesmo teste com soros de animais naturalmente infectados, encontrou as lipoproteínas LipL32 e LipL45 como sendo as principais proteínas imunorreativas. Biswas et al. (2005) utilizando o mesmo teste em soros de pacientes naturalmente infectados e com lisados de células totais, encontraram as lipoproteínas LipL32 e LipL45 como imunomodulantes. Capazes de reagirem com os soros dos pacientes convalescentes também encontraram as de 67, 65, 60 e 41 KDa.

Tabela 3 – Localização na membrana e exposição na superfície de lipoproteínas de *Leptospira interrogans*.

Designação	Massa (KDa)	Localização na membrana #	Exposição na Superfície **	LIC locus tag*
LipL21&	21	ME	+	LIC10011
LipL31	31	MI	-	LIC11456
LipL32&	32	ME	+	LIC11352
LipL36&	36	ME	-	LIC13060
LipL41&	41	ME	+	LIC12966
LipL46&	46	ME	+	LIC11885
LipL48	48	ME	?	LIC10898
LruB	50	MI	-	LIC10713
LruA&	71	MI	-	LIC11003
LigB	220	ME	+	LIC10464

Fonte: Adaptado de Matsunaga et al., 2006.

Determinação de localização na membrana segundo suas frações; MI (membrana interna); ME (membrana externa).

** Determinação da exposição ou não na superfície através de testes imunohistoquímicos.

* O LIC locus tag corresponde ao número de depósito da sequência no Genbank.

& Sorovariedades para as quais há dados experimentais evidentes de lipídeos associados à proteína correspondente.

2.7 Características gerais da LipL32

A LipL32 é a mais abundante proteína presente na membrana externa das leptospiros. Sua localização na superfície celular da *L. interrogans* foi provada por três experimentos independentes: imunofluorescência de superfície com anticorpos monoclonais específicos, anti-LipL32; por ELISA, realizado também com anticorpos monoclonais e por

imunomicroscopia eletrônica realizada com anticorpos monoclonais marcados com ouro coloidal. Nos três experimentos ficou comprovada a exposição da LipL32 na superfície celular (Cullen et al., 2005). A presença de anticorpos anti-LipL32 em soros de pacientes humanos vítimas de leptospirose coletados durante um surto da doença também foi comprovada através de Western blot. Os testes revelaram reação apenas entre as proteínas de 32 e de 45 KD

e seus respectivos anticorpos (Biswas et al., 2005). Este mesmo resultado foi encontrado por Lafetá et al. (2009) ao testar as PME da *L. interrogans* Hardjo subtipo hardjoprajtino frente ao soro de bovinos naturalmente infectados.

2.8 O gene LipL32

O gene LipL32 consiste de 816 pares de bases (pb) que codificam uma proteína de 272 aminoácidos (aa). Um local de ligação de ribossomo (seqüência Shine-Delgarno) (AAGGA) está presente antes do códon de iniciação. Uma seqüência invertida repetida localizada 30 pb após o códon de terminação pode funcionar como um finalizador da transcrição ribossomo-independente. Esta seqüência é seguida por uma região de elementos repetidos: uma seqüência de 12 pb que se repete quatro vezes após o gene na *L. kirschneri*, seis vezes após o gene na *L. interrogans*. A seqüência do gene LipL32 é altamente conservada entre as sorovarietades de leptospiros com percentual de similaridades que variam de 93,5% a 99,6% (Haake et al., 2000).

O gene LipL32 extraído de 15 amostras padrão de leptospiros isoladas na China foi seqüenciado. Nos sequenciamentos foram percebidas mutações, cinco aminoácidos, dentro de uma mesma espécie de *Leptospira*. Conseqüentemente as 15 amostras foram divididas em grupos segundo as variações encontradas. Ao expressarem as duas principais variantes do gene da LipL32 e testar seus produtos finais descobriu-se que as diferentes proteínas possuem potenciais imunogênicos ligeiramente diferentes (Luo et al., 2010).

2.9 Características estruturais da proteína LipL32

Por ser uma lipoproteína possui um peptídeo sinal na porção N-terminal composto por uma região básica amino-terminal (aa de 1 a 3), seu centro é hidrofóbico (aa de 4 a 19) e na parte carboxi-terminal há um sítio de clivagem da enzima peptidase II (sítio: ATT ACC GCT TGT) que, após ser utilizado, possibilita a formação da

proteína em sua forma madura (Haake et al., 2000). Durante a expressão da LipL32 em *E. coli*, o processamento pós traducional pode ficar incompleto e a proteína produzida pode ficar igualmente distribuída na membrana e no citoplasma. Após a LipL32 ser clivada pela peptidase II a proteína madura terá massa molecular igual a 27,6 KDa (Haake et al., 2000).

O gene LipL32 juntamente com os genes LipL21 e LipL41 derivados de diferentes sorovarietades patogênicas de leptospira foram seqüenciados. O gene da LipL32 apresentou uma variação passível de ser dividido em dois grupos. Os dois genes gerados LipL32-1 e LipL32-2 foram clonados e induzidos a expressar. As proteínas resultantes foram testadas separadamente ou em associação. Para cada uma delas foi feito um anti-soro específico. Para cada anti-soro foi feito um teste de ELISA para examinar os anticorpos específicos no soro de pacientes com leptospirose. Cada uma das LipLs foi testada quanto a sua capacidade protetora em porcos da Guiné. Também foram testadas as reações cruzadas existentes entre diferentes soros com cada uma das frações pelo teste de AMR. Os resultados mostraram que todas as proteínas produzem reações cruzadas entre si e que as duas variedades da LipL32 possuem níveis de detecção muito próximos no ELISA 98,7 e 96,9. Dentre os cinco antígenos testados (LipL21, LipL41-1, LipL41-2, LipL32-1 e LipL32-2) o antígeno LipL32-1 gerou o maior percentual de proteção (58,3% e 66,7% desafio com Lai e Pishu, respectivamente) (Luo et al., 2010).

2.10 Utilização da LipL32

Uma fração da LipL32 produzida em *E. coli* foi utilizada em teste ELISA indireto (Dey et al., 2004). As placas utilizadas nos testes foram sensibilizadas com 50 ng/poço do peptídeo recombinante, bloqueadas e provadas com 64 amostras de soros de cães positivos e 73 de cães negativos para leptospirose todos eles testados pelo Teste de Aglutinação Microscópica Rápida (AMR). Quando comparado com o AMR, o ELISA com peptídeo recombinante apresentou sensibilidade de 96,9%, especificidade de

97,3% e acurácia de 97,08%. Diante destes números, o teste foi considerado uma alternativa econômica para substituir o AMR.

A mesma metodologia foi utilizada para testar o soro de 150 bovinos suspeitos de estarem com leptospirose. Todos os soros foram testados pelo AMR, os soros positivos e negativos foram utilizados na padronização do teste. O teste de ELISA indireto feito com LipL32 recombinante foi 100% sensível e 100% específico em relação ao AMR com os soros diluídos 40 vezes. Os autores concluíram que o teste de ELISA indireto feito com a LipL32 recombinante é uma boa alternativa para a substituição do AMR (Bomfim et al., 2005).

A hemolisina HlyX teve sua atividade hemolítica potencializada pela LipL32. Ambas possuem atividade hemolítica quando estão sozinhas em concentrações superiores a 20 µg/ml (LipL32) e 25 µg/ml (HlyX). Porém, quando estão juntas as concentrações requeridas de cada uma delas para gerar hemólise em mais que 50% dos eritrócitos experimentais cai para 10 µg/ml (LipL32) e 20 µg/ml (HlyX) demonstrando haver uma via de atividade sinérgica entre as duas hemolisinas (Hauk et al., 2005).

O gene LipL32 foi utilizado em quatro construções genéticas que diferiam entre si no gene promotor. Os quatro plasmídeos foram introduzidos por eletroporação em células de *Mycobacterium bovis* -BCG - amostra Pasteur. Os experimentos de inoculação foram conduzidos intraperitonealmente utilizando as quatro amostras de *M. bovis* recombinantes, uma suspensão de leptospiros inativadas e uma amostra da BCG selvagem foram utilizadas como controle positivo e negativo respectivamente. Amostras do sangue dos animais inoculados foram coletadas a cada 21 dias e testadas por ELISA indireto e Western blot para confirmar a expressão do gene LipL32. Após setenta dias experimentais os animais foram desafiados com uma dose letal da sorovariedade Copenhageni. Os resultados dos testes *in vitro* demonstraram que das quatro

construções genéticas três estimularam o sistema imune dos animais experimentais de forma apropriada, estes animais produziram anticorpos anti-LipL32, e uma falhou. Nos testes desafio, duas das construções foram capazes de proteger 32,4% e 55,9% dos animais imunizados. Exames histopatológicos feitos nos animais demonstraram que tanto os animais vacinados com a BCG recombinante quanto aqueles vacinados com as amostras de leptospira inativadas não possuíam evidências clínicas da infecção ao contrário daqueles animais vacinados com BCG selvagem. Os resultados demonstraram que a LipL32 é um forte candidato a imunógeno no controle da leptospirose e que a BCG recombinante pode ser uma estratégia conveniente na formulação de vacinas (Seixas et al., 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Etapa 1- Escolha do antígeno

3.1.1 Amostra

L. interrogans sorovariedade Hardjobovis, Pomona, Wolffi e Icterohaemorrhagiae, amostras padrão (OMS) gentilmente cedidas pelo laboratório de leptospirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.1.2 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária, UFMG.

3.1.3 Cultivo das amostras

As amostras de leptospiros foram cultivadas em sistema estático a 30°C, utilizando-se o meio de cultivo EMJH (Ellinghausen e McCullough, 1965) em volume final igual a três litros. O cultivo inicial foi realizado com

um inóculo de 10% do volume final, com período final de incubação de sete dias.

3.1.4 Coleta e armazenamento dos soros utilizados nos testes de Western blot

Foram identificados cinco bovinos naturalmente infectados que apresentaram reações positivas para presença de aglutininas anti-leptospiras, detectados em reações sorológicas pelo Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Preventiva da UFMG. Foram coletadas 100 mL de sangue de cada um dos animais para realização dos testes de Western blot. Estas amostras foram acondicionadas em frascos plásticos apropriados e esterilizados, onde permaneceram em repouso por aproximadamente duas horas antes de serem transportados até o laboratório. Em seguida foi realizada a separação mecânica entre soro e coágulo, sendo este último descartado. Os soros foram fracionados e guardados a -20°C, em microtubos. Uma amostra do soro de cada animal foi testada quanto à positividade para leptospirose, com títulos iguais ou superiores a 100 no teste de Aglutinação Microscópica Rápida (AMR) (Ryu, 1970).

O soro de cada animal foi nomeado por letras do alfabeto para facilitar a identificação. O soro de dois animais denominados A e B são positivos para *L. Hardjo*. O soro C positivo para *Leptospiras Hardjo* e *Wolffi*. O soro D positivo para *Wolffi* e o soro E para *Pomona*.

3.1.5 Extração de proteínas da membrana externa

Para realização da extração seguiu-se a técnica descrita por Haake et al. (1991), com adaptações quanto ao volume utilizado:

- Três litros de cultivo de cada uma das amostras citadas no item 3.1.1 de *L. interrogans* com sete dias de crescimento a temperatura de 28°C foram utilizados. A cultura foi centrifugada a 8.000 x g a 4°C, durante 10 min. e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuscitado em 50 mL de PBS (0,01M Na₂HPO₄, 0,15M NaCl, pH 7,2) contendo 5 mM MgCl₂, por três vezes consecutivas. Posteriormente o precipitado foi ressuscitado em 2 mL TE (10mM de Tris hidróclorido - 2mM EDTA, pH 7,4). Foi adicionado à suspensão celular 1% de Triton X114 (Sigma-Aldrich) (v/v) e ela foi incubada a 4°C por 30 minutos. A suspensão foi então centrifugada a 8.500 x g, a 4°C, durante 10 min. Após a separação do sobrenadante, o cilindro protoplasmático foi ressuscitado em tampão FSB (62,5 mM Tris, 2% de SDS e 10% de glicerol) e estocado a -20°C. Adicionou-se 2% de Triton X114 (v/v) ao sobrenadante, que após aquecimento a 37°C por 10min, foi centrifugado a 2.000 x g por 10 min a temperatura ambiente. Após a centrifugação as duas fases presentes, aquosa e detergente, foram separadas com o auxílio de uma micropipeta e submetidas a um banho de gelo por 10 min. Acrescentou-se à fase aquosa 2% de Triton X114 (v/v) e, à fase detergente, nove partes do tampão TE, pH 7,4. As duas fases foram centrifugadas a 2.000 x g por 10 min a 4°C. Os procedimentos de separação de fases, resfriamento, adição de reagentes, aquecimento e centrifugação foram repetidos quatro vezes. Por fim, as duas fases (detergente e aquosa) foram separadas.

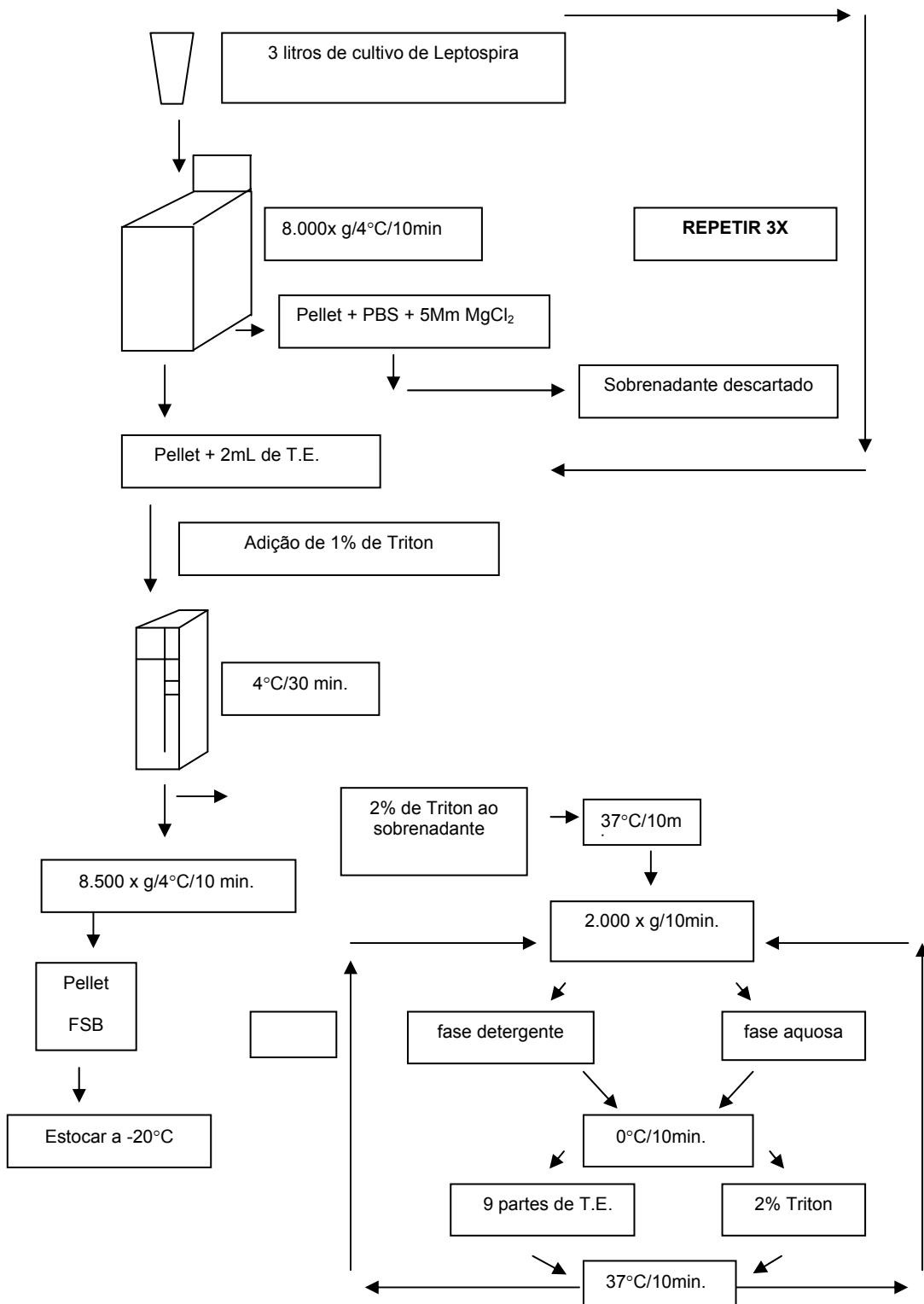


Figura 1. Esquema da extração das proteínas da membrana externa da *L. interrogans*

3.1.6 Precipitação protéica com acetona

As proteínas extraídas presentes nas fases (aquosa e detergente) foram precipitadas com 10 volumes de acetona em banho de gelo durante 45 minutos, segundo técnica descrita por Cunningham et al. (1988).

As duas frações foram centrifugadas a 12.600 x g a 4°C por 30 minutos. Após a centrifugação, a acetona presente no sobrenadante foi descartada e o pellet ressuspenso em 460 µL de solução de amostra (6,75 g de uréia, 65 µL de Triton X114, 250 µL de β-mercaptoetanol, 250 µL de IPG Buffer, pH 7-4 (Amersham Biosciences), em volume final de 12,5 mL de água ultrapura e estocado a -20°C.

3.1.7 Eletroforese em gel de poli(acrilamida) realizada com proteínas de membrana externada *Leptospira* spp. sob condições desnaturantes

Após o término da extração protéica, todos os extratos foram dosados por espectrofotometria com auxílio do QuantKit (Amersham Bioscience, cód. 80-6483-6) seguindo instruções do fabricante. Em seguida as proteínas foram separadas em gel de poli(acrilamida) em aparelho Mini PROTEAN II – (Bio Rad). Utilizou-se gel de concentração a 4% (Tampão 4X, pH 6,8 – 0,68 mL; PAS 10% 1,25 µL; Mix acrilamida - 335 µL; Temed - 1 µL Água ultrapura - 1,25 mL) e de separação a 12% ou a 15% de poli(acrilamida). Gel 12% (Tampão 4X pH8,8 – 5,0 mL; PAS 10% - 200 µL; Mix poli(acrilamida) 30% - 8 mL; Temed – 5 µL; Água ultra pura – 6,78 mL).

Foi padronizada a utilização de 0,85µg de proteína, equivalente a aproximadamente 5 µL de amostra por coluna, independente da sorovariabilidade e 4µL dos Padrões de Peso Molecular pré-corado (Código: LC 5925, Invitrogen) e não corados (código V8491 – Promega). O padrão pré-corado foi utilizado para os géis destinados ao teste de Western blot e o não corado para os géis destinados à coloração por prata.

A corrida foi realizada por 60 minutos a 150 v, com amperagem regulada automaticamente pela fonte. O tampão de corrida utilizado foi preparado com Tris 6,0g; Glicina 28,8g; SDS 2g e água ultrapura até o volume final de 1L.

3.1.8 Coloração do gel com nitrato de prata

Os géis foram corados por nitrato de prata segundo o protocolo descrito a seguir disponível no endereço eletrônico <http://www.icb.ufmg.br/lbem/protocolos/PROTOC36.html>. Incubação por 10 minutos em solução fixadora (Álcool absoluto-10mL; Ácido acético – 1,5 mL; Água ultrapura – 270mL), seguido por 10 minutos em solução de prata (nitrato de prata - 0,2 a 0,3 g; Água ultrapura – 30 mL), finalizando com 5 -7 minutos em solução de revelação (NaOH – 3 g; Formol – 0,5 mL; Água ultrapura- 100 mL).

3.1.9 Análise por Western blot

Os géis provenientes da eletroforese tiveram suas proteínas transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 45 µc, em um aparelho Minitransblot (Bio-Rad), sob corrente elétrica de 100 volts por 60 minutos, amperagem controlada automaticamente pela fonte e tampão de transferência preparado a partir de Tris – 5,82 g; glicina – 2,93 g; SDS – 0,37 g e água ultrapura até volume final de 1L, sem ajuste de pH, utilizando-se na diluição final 20% de metanol.

Após 1 hora de corrida eletroforética, a membrana foi colocada em solução de bloqueio (leite em pó desnatado - 10 g; Tween 20 - 40µL em 200mL de tampão Tris-salino (TBS) (0,5M Tris; 1,5M NaCl; ajuste de pH para 7,5) “overnight” a 4°C. Seguida da adição de soro de campo citado no item 3.1.4, cuja diluição padronizada para este experimento foi de 50 vezes. A reação foi realizada a temperatura ambiente. A membrana ficou por 1 hora, seguido por três lavagens de 10 minutos cada, com solução TBS também a temperatura ambiente. A membrana foi incubada novamente por 1

hora em solução de anti-IgG bovina marcada com peroxidase (Sigma, código A5295). Novamente passou por três lavagens com TBS e então à etapa de revelação. A revelação foi realizada utilizando DAB (kit Sigma Fast – DAB Tablet Sets, cod. D429350SET), segundo instruções do fabricante.

3.2 Etapa II - Clonagem e subclonagem do gene LipL32

3.2.1 Amostras Utilizadas

Leptospira interrogans sorovariedade Hardjo subtipo hardjoprajtino (amostras OMS) cedida pelo Laboratório de Zoonoses da EV-UFMG. *Escherichia coli* amostra XL1-Blue quimiocompetente (Phoneutria) utilizada nos experimento de propagação do vetor. *Escherichia coli* amostras BL 21, BL 21 C41, BL 21 C43 com e sem pLysS eletrocompetente (Phoneutria) utilizadas nos experimentos de expressão.

3.2.2 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária, UFMG; Os sequenciamentos foram realizados no Centro de Estudo do Genoma Humano, Universidade de São Paulo e no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, ICB, UFMG.

3.2.3 Meios e condições de cultivo

As leptospiros foram cultivadas em meio EMJH (Ellinghausen e McCullough, 1965), em sistema estático a 29°C + ou – 1 por sete dias.

Para o crescimento da amostra de *E. coli* XL1-Blue foi utilizado o LB agar seletivo com 50 µg/ml de ampicilina (Phoneutria), incubado a 37°C por 24 h e em LB caldo seletivo com 50 µg/ml de ampicilina (Phoneutria).

As amostras de *E. coli* BL21, BL21 C43 e BL21 C41 com pLysS foram cultivadas em LB ágar seletivo (Phoneutria) com 50 µg/ml de ampicilina, em estufa a 37°C por 24 h, nos experimentos de transformação e manutenção das amostras transformadas e cultivo a 37°C. Nos experimentos de expressão e de propagação do plasmídeo, as amostras de *E. coli* BL21, BL21 C43 e BL21 C41 com pLysS, foram inoculadas em LB caldo seletivo com 50 µg/ml de ampicilina (Phoneutria), sendo o cultivo realizado sob condições variáveis.

3.2.4 Gene

O gene que codifica a proteína LipL32, gene LipL32, utilizado na construção dos iniciadores encontra-se registrado no GenBank sob o número de depósito AY609328.

3.2.5 Plasmídeo

Foi utilizado o plasmídeo pet 21 A (Novagen) cujo mapa e a descrição completa é encontrado no endereço eletrônico: <https://wasatch.biochem.utah.edu/chris/links/pET21.pdf>.

3.2.6 Iniciadores

O par de iniciadores LipL32 senso e LipL32 anti-senso foram construídos com a ajuda do programa PRIMER 3 disponível no endereço digital (<http://primer3.sourceforge.net/>). Os demais primers são comerciais e se anelam no vetor TOPO TA (par M13) e no vetor pet 21 A (T7).

Quadro 1. Iniciadores utilizados.

Nome	Direção	Sequencia
LipL32	Senso	5'- GTCGAC aaATTTTGGCTATCTCCGTTG -3'
LipL32	Ant-senso	5' GTCGAC TGACTCTTCAGCAGCGATAGC -3'
M13	Senso	5' - GTAAAACGACGGCCAG -3'
M13	Anti-senso	5' - CAGGAAACAGCTATGAC -3'
T7	Senso	5' - TAATACGACTCACTATAGGG -3'

Grifado em amarelo encontra-se o sítio da enzima de restrição Sall.

Em letras minúsculas encontram-se dois nucleotídeos acrescentados ao iniciador com a finalidade de colocar o fragmento na ordem correta de leitura (*frame*) quando inserido no vetor pet 21A.

3.2.7 Clonagem do gene LipL32 no vetor pet 21A

A porção do gene LipL32 responsável pela síntese da proteína LipL32 madura com aparente massa molecular de 28 KDa foi utilizada para a construção dos iniciadores LipL32 com o auxílio do Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>). O programa Primer3 evita porções do gene que se repetem anulando a possibilidade de múltiplos anelamentos. Em decorrência desta característica, a porção a ser amplificada por este par de iniciadores não possui os cinco últimos nucleotídeos da porção 3' nem os nucleotídeos responsáveis pela síntese do peptídeo sinal de exportação da LipL32.

Ao par de iniciadores LipL32 proposto pelo Primer3 foi acrescentado o sítio da enzima de restrição Sall nas duas extremidades e dois nucleotídeos de forma a adequar o gene LipL32 a frame 1 utilizada nos vetores A da linha pet (Novagen). Escolheu-se a enzima Sal I por ela ter somente um sítio de restrição no vetor TOPO TA e por ser comum ao vetor pet 21 A.

A descrição da construção encontra-se abaixo.

Em verde encontra-se o sítio da enzima EcoRI, em amarelo o sítio da enzima Sall, os iniciadores encontram-se grifados e em cinza encontra-se a porção do gene LipL32 a ser amplificada.

ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCC**GAATTC**GAGCTCC**GTCGACaaATTTTGGCTATCTCCGTTG**CACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCCTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAAACGAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGA TCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGTTTAGTCGATGGAAACAAAA AAGCATACTATCTCTATGTTTGGATTCCCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAAC AGGCGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCACCCAGAGAA AAATCAATGCCACATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATGTCGGCGATTATGCCTGACAAA TCGCCAAAAGCTGCGAAAAGCAAAACAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAA AGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGAC GATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTATA AACCAGGTGAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTCCCACCAGGTATCCAGGTGT GAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTGCAAAAACAA**GCTATCGCTGCTGAAGAGTCAgtcgac** AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

3.2.8 Sequência de aminoácidos esperada

MASMTGGQOMGRGSEFELRRQILAI SVALFASITACGAFGGLPSLKSSFVLS EDTIPGTNETVKTLLPYG
SVINYGYVVKPGQAPDGLVDGNKKAYLYVWI PAVIAEMGVRMISPTGEIGEPGDGLVSDAFKAATPEE
KSM^{PHW}FD^{TWIR}VER^{MSAIM}PDQIAKAAKAKPVQKLD^{DDDD}GD^{DD}TYKEERHNKYN^{SLTRIKI}PNPPK^{SFD}
DLKNIDTKKLLVRGLYRISFTTYKPEVKGSFVASVGLLFP^{PGI}PGVSPLIHSNPEELQKQAI^{AAEESVD}
KLAAALEHHHHHHH

3.2.9 Extração do DNA genômico da Leptospira

A extração do DNA da Leptospira foi realizada com o Kit de extração GTS (Phoneutria), seguindo as instruções do fabricante.

3.2.10 Reação em Cadeia da Polimerase

A PCR foi conduzida utilizando-se 200 ng de DNA genômico, quantificado em Nanodrop, e com 20 picomoles de cada um dos iniciadores LipL32 senso e anti-senso por reação, usando a padronização de ciclos descrita abaixo:

Quadro 2. Padronização 1 utilizado na amplificação do gene da LipL32 por meio da PCR

Número de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
1	94°C por 2 min	-----	-----
33	90°C por 20 s	45°C por 30 s	72°C por 1 min
1	-----	-----	72°C por 6 min

3.2.11 Visualização dos produtos da PCR

As bandas foram visualizadas em gel de agarose 1% feito em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 0,1 mM EDTA) pré-corado com 1 µl/100 ml de brometo de etídio diluído a 0,5 mg/ml. A corrida se deu a 120 volts, amperagem livre, por 35 minutos.

3.2.12 Clonagem em vetor de propagação

O vetor TOPO TA 2.1 (Invitrogen, K4500) foi utilizado como vetor de propagação. A clonagem do gene de interesse, proveniente da PCR descrita no item 3.3.10, foi realizada seguindo as instruções do fabricante.

3.2.13 Transformação

A *E. coli* XL1-Blue quimiocompetente (Phoneutria) foi utilizada na transfecção do TOPO TA ligado ao inserto seguindo instruções do manual de utilização da célula.

3.2.14 Cultivo das células transformadas

O X-Gal (Promega, cód.: V3941) foi utilizado como indicador de transformantes com o inserto, 15 µl do produto a 50mg/ml foram espalhados sobre o meio LB ágar (Bertani, 1951) seletivo antes da inoculação dos transformantes. As placas com as células transformadas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

3.2.15 Seleção dos clones positivos contendo o inserto – PCR de colônia

Todas as unidades formadoras de colônias (UFCs) que apresentavam a coloração branca foram novamente plaqueadas, numeradas e testadas por PCR para a presença do inserto. Os iniciadores LipL32 senso e LipL32 anti-senso foram utilizados nesta PCR. Cada uma das UFCs brancas foi utilizada como DNA molde em uma reação de amplificação realizada com os ciclos da padronização 1 modificado. Seguindo instruções do fabricante do vetor

TOPO T7A. A modificação foi realizada acrescentando-se aos ciclos da padronização 1, descrito acima, um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 10 min.

Todos os clones positivos na PCR foram subcultivados em LB (Bertani, 1951) ágar seletivo. Uma pequena amostra do novo cultivo, coletada com ponteira, foi utilizada

como DNA molde em uma nova PCR com iniciadores externos ao inserto e compatíveis com o vetor TOPO TA. Esta PCR foi realizada de acordo com os ciclos descritos no quadro abaixo:

Par de iniciadores M13 senso e M13 anti-senso

Quadro 3. Padronização 2 utilizado na amplificação do gene da LipL32 inserido no vetor TOPO TA por meio da PCR

Número de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
1	94°C 10 min	-----	-----
32	90°C 20s	55°C 30 s	72°C 1min
1	-----	-----	72°C 10 min

O fragmento amplificado nesta nova reação foi resolvido em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo. Após a corrida eletroforética a 120 volts, a banda do gel contendo o produto amplificado após o corte foi purificada seguindo protocolo descrito no item seguinte.

3.2.16 Purificação de banda de gel

O DNA contido na banda do gel foi purificado em uma coluna de lã de vidro criada dentro de um tubo de mini centrífuga de 0,6 ml que previamente foi furado no fundo por uma agulha. A banda do gel foi cortada, congelada em um saquinho feito de parafilme, macerada ainda dentro do saquinho e depositada cuidadosamente dentro da coluna de lã de vidro. O tubo de 0,6 ml foi colocado dentro de um tubo de 1,5 ml e centrifugado a 9.460 g por cinco minutos, recolhido o sobrenadante, centrifugou se os tubos à mesma rotação por mais cinco minutos e, novamente, recolheu-se o sobrenadante. Ao volume total do sobrenadante recolhido acrescentou se 10% de solução de acetato de sódio 3 M e 100% do volume de álcool isopropílico. A mistura foi incubada por 30 minutos a -20°C e centrifugada por 12 minutos a 9.460 x g. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 200 µl de etanol 70% gelado, novamente centrifugado por 10 minutos a 9.460 g, o sobrenadante descartado e o

tubo de 1,5 ml incubado aberto em estufa a 37°C por dez minutos ou até o etanol secar por completo. O precipitado foi ressuscitado em 20 µl de água ultra-pura estéril.

3.2.17 Estimativa do DNA purificado

A quantidade de DNA purificado foi estimada em gel de agarose 2% tendo como parâmetro de comparação o Low DNA mass (Invitrogen) seguindo instruções de fabricante.

3.2.18 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram conduzidas seguindo o protocolo cedido pelo Laboratório prestador de serviço. Em cada reação de sequenciamento usou-se 125 ng de DNA amplificado purificado e 2,5 picomoles de primer M13 senso ou anti-senso.

3.2.19 Análise dos sequenciamentos

Os programas Alinger 3.0.3, BioEdit, Multi Alinger e ferramentas como Blast, esta última disponível no site do Gen Bank, foram utilizados na análise das seqüências de diversos clones. O Blast foi utilizado para checar e comparar as seqüências resultantes com as diversas seqüências já

depositadas nos bancos de gene (GenBank).

3.2.20 Extração de plasmídeos

O clone que continha o plasmídeo escolhido para dar continuidade aos trabalhos foi cultivado em LB caldo seletivo por 14 horas a 37°C, sob agitação de 250 rpm. Após o final do cultivo o plasmídeo foi extraído por lise alcalina segundo Birnboim e Doly (1979).

3.2.21 Digestão enzimática

Tanto o plasmídeo TOPO TA (Invitrogen) contendo o inserto quanto o plasmídeo de expressão pet 21A (Novagen) foram digeridos com a enzima Sal I (Invitrogen, cód: 15217-011) seguindo instruções do fabricante.

3.2.22 Purificação dos fragmentos de interesse

As duas reações de restrição, com o TOPO TA e com o pet 21A foram submetidas a corrida eletroforética como descrito no item 3.3.11 e as bandas de interesse foram purificadas como descrito no item 3.3.16 e quantificadas como descrito no item 3.3.17.

3.2.23 Reação de ligação

Após os fragmentos de interesse terem sido purificados da banda do gel, o plasmídeo pet 21 A foi desfosforilado com fosfatase alcalina (Promega, cód.: M8201), seguindo instruções do fabricante. Os fragmentos digeridos foram então ligados com o auxílio da T4 Ligase (Promega, cód: M1801) seguindo o protocolo descrito no quadro abaixo:

Quadro 4. Reações de ligação do inserto – gene LipL32 – no vetor de expressão pet 21A

Número da reação	1	2	3	4	5
Vetor	0,8 µL	0,8 µL	0,8 µL	0,8 µL	0,8 µL
Tampão	1 µL	1 µL	1µL	1µL	1µL
Inserto de DNA	1 µL	2 µL	3µL	4µL	6µL
Enzima	1 µL	1µL	1µL	1µL	1µL
Água	6,2µL	5,2µL	4,2µL	3,2µL	1,2µL

As cinco reações descritas acima foram incubadas a 4°C. Após 16 horas elas foram reunidas em um único tubo e precipitadas com a adição de 10% do volume total de acetato de sódio 3 M e dois volumes de etanol 100%. A mistura foi incubada a - 20°C por 30 minutos e centrifugada a 9.460 g por 15 minutos. O pellet foi lavado com etanol 70% duas vezes e novamente centrifugado por mais cinco minutos a 9.460 g. O precipitado então secou completamente na estufa a 37°C e foi ressuspenso em 10 µL de água ultra-pura estéril.

3.2.24 Transfecção do pet 21A em células de propagação:

Uma alíquota da célula XL1-BLUE quimiocompetente (Phoneutria) foi transformada com 5 µL da reação de ligação final seguindo protocolo de transformação do fornecedor da célula. O

volume total da transformação foi distribuído em quatro placas de LB ágar seletivo que foram incubadas a 37°C por 24 horas.

3.2.25 Testando as UFCs resultantes da transformação com pet 21A

Todas as colônias que cresceram nas placas inoculadas (LB ágar seletivo) com as células transformadas foram testadas por PCR para a presença do inserto. Utilizou-se o ciclo padronização 1 modificado, acrescido de 10 minutos iniciais a 94°C.

3.2.26 Teste de restrição dos clones positivos na PCR

A metade dos clones positivos na PCR foi cultivada a 37°C por 14 horas, sob agitação, foram centrifugados e tiveram seus plasmídeos extraídos por lise alcalina

(Bimboim e Doly, 1979). Uma amostra de 10 μ l de cada plasmídeo foi submetida a um ensaio de restrição com a enzima Sall seguindo instruções do fabricante.

3.2.27 Sequenciamento dos clones selecionados

Todos os clones que, além de terem sido positivos na PCR, liberaram um inserto com tamanho esperado na reação de restrição foram seqüenciados com o iniciador senso do promotor T7 e anti-senso LipL32 segundo metodologia utilizada no laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG).

3.2.28 Testes de expressão

3.2.28.1 Cultivo das amostras de *E. coli* transformadas

As amostras de *E. coli* BL21, BL21 C43 e BL21 C41 com pLysS foram cultivadas em LB caldo seletivo com volume final igual a 10 mLs, como descrito no item 3.3.3, até atingirem densidade óptica (D.O.) em comprimento de onda igual a 600 nm superior a 0,6 e inferior a 1. Neste momento uma alíquota de 1 mL era retirada e o volume restante era induzido. A expressão do gene da LipL32 foi induzida com isopropil β -D-1 tiogalactopiranosídeo (IPTG), sob agitação de 250 rotações por minuto (rpm) por quatro horas.

3.2.28.2 Quanto à linhagem celular utilizada e à UFC

Das amostras de *E. coli* (descritas no item 3.3.28.1) foram testadas cinco UFCs derivadas de cada uma delas. Cada UFC foi cultivada, induzida com IPTG e testada quanto a quantidade de proteína expressada usando a eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes.

3.2.28.3 Concentração de IPTG utilizada para indução

Foram testadas as concentrações de IPTG de 1 mM, 1,3 mM, 1,6 mM e 2 mM.

3.2.28.4 Temperatura

Além da temperatura de 36,5°C, as temperaturas de 20°C de 34°C também foram testadas mantendo-se as demais condições de cultivo.

3.2.29 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Todas as metodologias de expressão utilizadas foram testadas em gel de poliacrilamida 12%. Após quatro horas de incubação pós-indução a D.O. dos cultivos foi medida e utilizada para se determinar o volume de tampão de amostra para eletroforese que seria utilizado para ressuspender 1mL de cultivo. A mesma conta foi realizada para a alíquota do cultivo retirada antes da indução. O volume de cultivo necessário para a realização dos testes foi retirado, centrifugado a 7000 g por dez minutos a temperatura ambiente, e ressuspensionado no volume apropriado para a D.O. (600 nm) que o cultivo apresentava no momento da coleta da alíquota. Para exemplificar, imaginemos que antes da indução o cultivo apresentava D.O. igual a 0,75 e após as quatro horas de indução sua D.O. estivesse igual a 3.00. Desta forma cada mL de cultivo retirado antes da indução deve se ressuspensionado em 75 μ L de tampão de amostra e cada mL retirado após as quatro horas de indução deve ser ressuspensionado em 300 μ L de tampão de amostra. Este método garante que a concentração de proteínas colocada em cada coluna se mantém constante se dispensado em cada uma delas volumes iguais de lisado total de *E. coli*. Para garantir o rompimento das células e a linearização das proteínas contidas nelas cada amostra foi aquecida a 100° C por cinco minutos com auxílio de ebulidor antes da aplicação. Os volumes da amostra aplicados foram testados variando de 5 μ L a 20 μ L. Decidiu-se por aplicar 10 μ L de extrato total por coluna. Extrato total de *E. coli* não induzida foi utilizado como controle negativo. Todos os géis foram feitos com padrão de proteínas pré-corado (Invitrogen, LC5925 ou 10.748-010).

3.2.30 Verificação da expressão após purificação do lisado da *E. coli*

Na tentativa de se observar melhor a expressão da proteína LipL32 o lisado total de *E. coli* induzida foi purificado por cromatografia de afinidade com coluna de níquel - HisTrap FF crude Kit (GE Healthcare, 28-4014-77) de acordo com as instruções do fabricante.

Após a purificação todas as frações recolhidas da coluna foram testadas por SDS-PAGE e coradas com Coomassie Blue

MHHHHHSSGVDLGTENLYFQSMILAISVALFASITACGAFGGLPSLKSSFVLS EDTIPG
TNETVKTL LYPYGSVINYYGYVKPGQAPDGLVDGNKKAYLYVWIPAVIAEMGVRMIS
PTGEIGEPGDGDLVSDAFKAATPEEKSMPHWFDTWIRVERMSAIMPDQIAKAAKAKPV
QKLD DDDDDGDDTYKEERHNKYNLSLTRIKIPNPPKSFDDLKNIDTKKLLVRGLYRISFTT
YKPGEVKGSFVASVGLLFPPGIPGV SPLIHSNPEELQKQAI AAEES

Figura 2. Sequência requerida: Cauda H + TEV + LipL32

Esta seqüência de aminoácidos foi utilizada como modelo da transcrição do gene da LipL32 produzido de forma sintética com códons otimizados inserido no plasmídeo de expressão pJexpress404 (promotor de expressão T5, resistente a ampicilina, região de origem pUC) na empresa DNA 2.0 (Califórnia, Estados Unidos - www.DNA20.com).

Os sítios de restrição EcoR I (N-Terminal), Bam HI e Hind III (C-Terminal) foram utilizados para flanquear o inserto possibilitando a troca do plasmídeo de expressão caso isto fosse necessário.

3.3.2 Experimento de propagação

O plasmídeo pJexpress 404 clonado com o gene LipL32 foi propagado em células de *E. coli* XL1-Blue (Phoneutria). Após 14 horas de cultivo em LB seletivo para células resistentes a ampicilina o plasmídeo foi extraído por lise alcalina (Bimboin e Doly, 1979). O plasmídeo foi ressuspendido em

3.3 Etapa III - Planejamento da síntese do gene LipL32 no plasmídeo pJexpress 404

3.3.1 Planejamento da expressão do gene que codifica a proteína LipL32 madura

Acrescentou-se à seqüência da proteína LipL32 traduzida resultante das sequencias geradas pelos experimentos da Etapa III códon de iniciação, já que o códon natural da proteína que antecedia seu peptídeo sinal de exportação não foi utilizado, cauda de histidina, sítio de clivagem da cauda (TEV) e códon de parada resultando na seqüência de aminoácidos descrita na figura abaixo:

200µl de água ultra-pura e congelado a -20°C.

3.3.3 Transformação das Células de expressão

As linhagens de *E. Coli* BL21 C43 e C41 com pLysS (Phoneutria) foram transformadas com 100 ng do plasmídeo pJexpress clonado com o gene LipL32 segundo protocolo de transformação da célula, descrito pelo fornecedor (Phoneutria).

3.3.4 Testes de expressão

Todos os testes de expressão foram realizados conforme descritos no item 3.3.28 e subitens 3.3.28.1, 3.3.28.2, 3.3.28.3 e 3.3.28.4.

3.3.5 Purificação da LipL32

A LipL32 foi purificada por cromatografia de afinidade com coluna de níquel - HisTrap FF crude Kit (GE Healthcare, 28-4014-77) de acordo com as instruções do fabricante.

Após a purificação todas as frações recolhidas da coluna foram separadas por SDS-PAGE, a fração da eluição que apresentava a proteína purificada foi utilizada nos testes de Western blot feitos com soro de bovinos.

3.4 Etapa IV- Testes com a proteína LipL32

3.4.1 Produção de soro hiperimune em coelhos

O soro hiperimune foi produzido utilizando-se dois coelhos da raça Nova Zelândia, pesando aproximadamente 3 Kg/animal. Os animais foram mantidos em condições adequadas, recebendo água e alimentos *ad libitum*, seguindo as normas de procedimentos recomendadas por organismos internacionais (National Research Council, 1996). Cada coelho foi testado quanto à presença de aglutininas anti *L. interrogans* sorovarietades *hardjoprajitno* (OMS) e *hardjobovis*, pela técnica de AMR, descrita por Ryu (1970). Após confirmação da negatividade pelos exames, iniciou-se protocolo de imunização, conforme recomendado pelo Subcomitê Taxonômico de *Leptospira* (TSCL) da União Internacional da Sociedade de Microbiologia (Faine et al., 1999) com as seguintes modificações:

Os coelhos receberam doses progressivas de *L. interrogans* sorovarietade Hardjo subtipo *hardjoprajitno* (OMS) com sete dias de incubação. A primeira dose, inoculada no dia 1, utilizou leptospiros cultivadas em 1 mL de meio de cultivo; a segunda dose, inoculada no dia 7, utilizou 2 mL de cultivo; a terceira dose, inoculada no dia 14, utilizou 4 mL de cultivo e a quarta dose, inoculada no dia 21, utilizou 6 mL de cultivo. Cada mL de cultivo continha aproximadamente 1×10^9 leptospiros. Cada dose foi centrifugada a $7.500 \times g$ por 10 min. Após a centrifugação o pellet foi ressuscitado em 1mL de salina fosfatada tamponada - PBS (0,13 M NaCl, 0,002 M KCl, 14 mM KH_2PO_4 , 0,0096 M $NaHPO_4$) estéril, pH 7,2 e novamente centrifugado a $7.500 \times g$ por 10 min. O processo de lavagem em PBS foi repetido por três vezes a fim de retirar das células de leptospira quaisquer resíduos de meio de

cultivo. Ao final da lavagem cada dose foi ressuscitada em volume fixo, 1 mL, de PBS. As inoculações foram realizadas nos dias citados acima, de forma intravenosa na veia marginal da orelha. Quatorze dias após a última inoculação, uma amostra do soro de cada coelho foi testada e titulada quanto à presença de aglutininas anti *L. interrogans* sorovarietade *hardjo* (OMS) pela técnica de AMR (Ryu, 1970). Uma semana após a titulação os coelhos foram sangrados e eutanaziados seguindo as recomendações da resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária n. 714, de 20 de junho de 2002. O sangue foi centrifugado a $3.000 \times g$ e o soro separado em alíquotas e estocado a $-20^\circ C$

3.4.2 Western blot com extrato total de *E. coli* com soro de coelho

Soros de dois coelhos hiperimunizados de acordo com protocolo descrito no item 3.4.1 foram utilizados nos testes.

Nas duas extremidades do gel de poliacrilamida foram aplicados 6 μL de padrão pré-corado e nas demais oito colunas foram aplicados 10 μL de extrato total de *E. coli* não induzida intercalados com 10 μL de extrato total de *E. coli* induzida. A corrida aconteceu sob corrente de 150 v, amperagem livre por uma hora no aparelho Mini PROTEAN II (Bio Rad). Utilizou-se tampão Tris-Glicina (Tris 6,0g; Glicina 28,8g; SDS 2g e água ultrapura até o volume final de 1L), gel de concentração a 4% (Tampão 4X pH 6,8 – 0,68 mL; PAS 10% 1,25 μL ; Mix acrilamida 30% - 335 μL ; Temed - 1 μL Água ultrapura - 1,25 mL) e de separação a 12% (Tampão 4X pH8,8 – 5,0 mL; PAS 10% - 200 μL ; Mix poliacrilamida 30% - 8 mL; Temed – 5 μL ; Água ultra pura – 6,78 mL). A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada no Transblot Bio-Rad sob corrente elétrica de 110 v por uma hora. Após a transferência a membrana foi bloqueada por uma hora à temperatura ambiente ou overnight a $4^\circ C$ imersa em TBS (Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5) contendo 2,5% de leite em pó desnatado e 0,0005 % (v/v) de Tween 20. As duas amostras de soro foram diluídas 100X em

TBS e foram incubados com as membranas por uma hora à temperatura ambiente. A membrana foi lavada 3x por dois minutos com TBS e sucedeu-se a incubação por uma hora com o anti IgG de coelho (monoclonal, anti rabbit Sigma A1949) conjugada com peroxidase diluído 1000 X. A revelação do teste foi feita com DAB FAST (Sigma, D4293).

3.4.3 Soros de bovinos naturalmente infectados

Os soros dos bovinos foram cedidos pelo Laboratório de Leptospirose da Escola de Veterinária – UFMG após serem testados pela técnica de AMR (Ryu, 1970) quanto à presença de anticorpos anti leptospira. Todos os soros positivos utilizados possuíam títulos no AMR (Ryu, 1970) superior a 400.

3.4.4 Western blot com soros de bovinos realizados com LipL32 purificada

Após a separação das proteínas em SDS-PAGE e sua transferência para membranas de nitrocelulose realizou-se o bloqueio foi feito com soro de coelho negativo para aglutininas anti leptospira diluído 100 vezes em TBS por uma hora a temperatura ambiente. Após serem lavadas três vezes em TBS com 0,0005% (v/v) de Tween 20 as membranas foram incubadas com os soros primários por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, fez-se nova lavagem por 3X e a reação com antiovino conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 2000X (v/v) por uma hora a temperatura ambiente. Todos os nove soros positivos apresentavam títulos superiores a 1:400 para pelo menos uma amostra de *Leptospira interrogans*. A revelação da membrana foi feita como no item 3.4.2.

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Etapa I - Escolha do antígeno

Nesta etapa comparou-se o perfil protéico das sorovariedades de *L. interrogans*

Hardjobovis, Pomona, Wolffi e Icterohaemorrhagiae. Estes experimentos tiveram a finalidade de definir os componentes protéicos mais encontrados e em maior quantidade na membrana externa dessas sorovariedades de *Leptospira* e verificar quais deles apresentam reações mais expressivas nos testes de Western blot realizados com proteínas nativas.

4.1.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes

Os géis de poliacrilamida foram fotografados e os valores foram inferidos tomando-se por base o Padrão de Massa Molecular (PMM) Promega (V8491) (Fig.3). Os resultados encontrados demonstram grande semelhança entre os quatro perfis das PME estudadas. As proteínas com massas moleculares iguais a 22, 29, 32, 36, 41 e 48 KDa foram comuns as quatro sorovariedades testadas. Outras bandas foram observadas em todas as sorovariedades.

Na sorovariedade Hardjobovis observou-se a presença de 13 bandas, cujas massas moleculares foram estimados em 150, 100, 68, 55, 52, 48, 45, 41, 36, 32, 29, 24 e 22 KDa.

Na sorovariedade Wolffi oito bandas de PME, de massas moleculares estimados em 68, 48, 41, 36, 32, 29 e 22 KDa foram visualizadas nos géis.

Os géis unidimensional da Icterohaemorrhagiae ao serem analisados mostraram 10 bandas de massas moleculares estimados em 75, 68, 58, 48, 41, 37, 36, 32, 29 e 22 KDa.

Em relação a sorovariedade Pomona foram visualizadas oito bandas de proteínas de membrana externa de massas moleculares estimados em 68, 52, 48, 41, 36, 32, 29 e 22 KDa.

Tabela 4. Massas moleculares das proteínas observadas nas sorovarietades Hardjobovis, Wolffi, Icterohaemorrhagiae e Pomona.

Sorovarietades	Massas Moleculares das proteínas que se coraram												
Hardjobovis	150	100	68	55	52	48	45	41	36	32	29	24	22
Wolffi			68			48		41	36	32	29		22
Icterohaemorrhagiae			75	68	58		48	41	37	36	32	29	22
Pomona			68			52	48	41	36	32	29		22

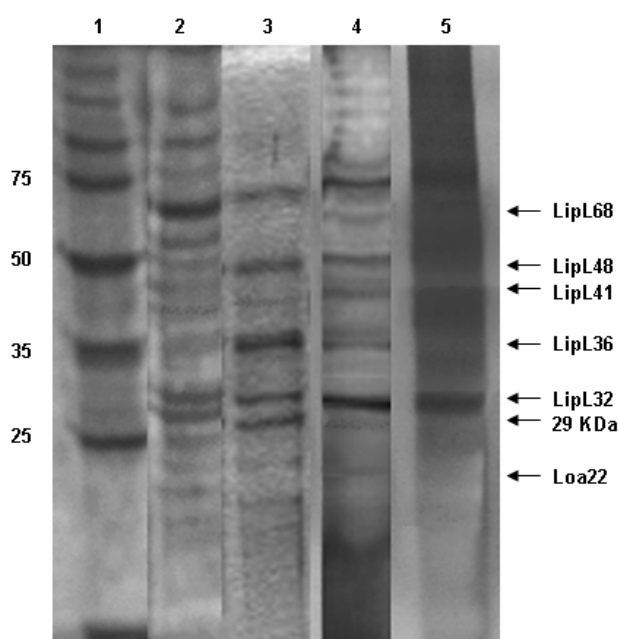


Figura 3. Gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, corado com nitrato de prata das proteínas de membrana externa da *L. interrogans* sorovarietades Hardjobovis, Wolffi, Icterohaemorrhagiae e Pomona. As PME (0,85µg/coluna) foram separadas sob corrente elétrica de 150 v, amperagem livre, por uma hora. Coluna 1 - Padrão de massa molecular de proteína (em KDa); Coluna 2: PME da sorovarietade Hardjobovis; Coluna 3: PME da sorovarietade Wolffi; Coluna 4: PME da sorovarietade Icterohaemorrhagiae; Coluna 5: PME da sorovarietade Pomona.

4.1.2 Teste de Western blot com proteínas das membranas externas das amostras Hardjobovis, Wolffi, Icterohaemorrhagiae e Pomona

Para a análise do teste de Western blot, as membranas foram fotografadas por câmera digital e, ao final de cada experimento os valores foram inferidos tomando-se por base

o Padrão de Massa Molecular pré-corado (Invitrogen – LC5925).

Os testes de Western blot foram realizados nos soros de bovinos naturalmente infectados. Cada soro havia sido testado quanto à presença de aglutininas anti *Leptospira* e se mostrou reagente a uma ou duas sorovarietades. Todos os soros

utilizados apresentavam títulos superiores a 400.

Os resultados encontrados nos testes de Western blot estão apresentados na figura 4.

As proteínas de massas moleculares de 22, 29, 32, 41, 45, 52 e 75 KDa foram reagentes

em todas as sorovarietades. Outras proteínas com pesos moleculares inferiores a 22 KDa que também reagiram não foram discutidas já que não há descrição das mesmas e, como já foi descrito por Cullen et al.(2002) são formas degradadas de proteínas de maior peso molecular. As reações mais intensas foram observadas nas proteínas de massas moleculares de iguais a 22, 29, 32, 41, 45 e 52 KDa.

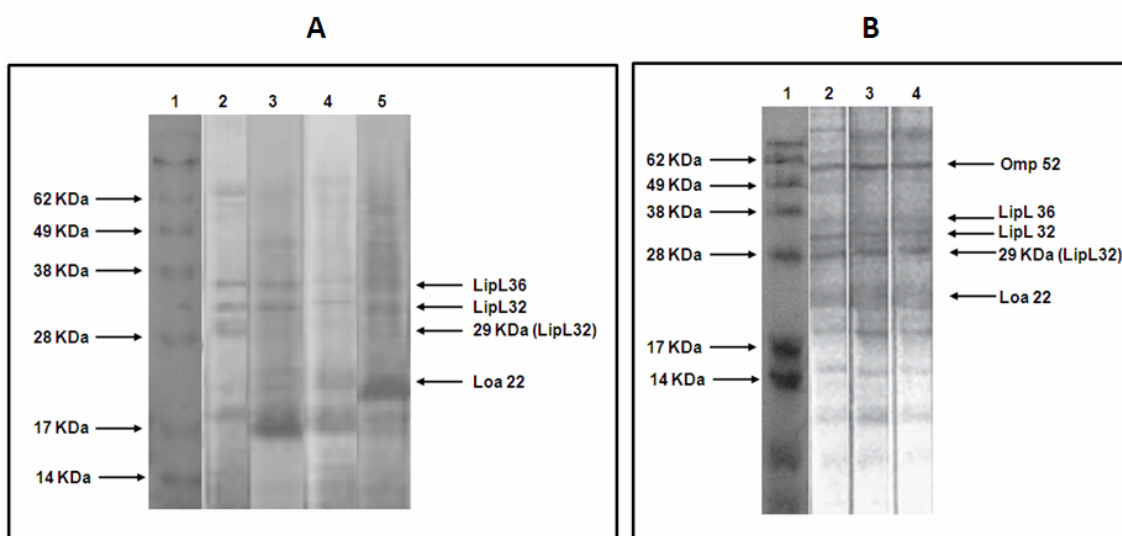


Figura 4 – Testes de Western blot realizados com a *L. interrogans* sorovarietades Hardjobovis; Icterohaemorrhagiae; Pomona e Wolffi, provados com soros de bovinos naturalmente infectados, reagidos com anti IgG bovina conjugada com peroxidase e revelada com DAB.

Legenda:

Figura 4, A: Testes realizados com gel de poliacrilamida 12%. Coluna 1: Padrão de massa molecular de proteína (em KDa); Coluna 2: sorovarietades Hardjobovis; Coluna 3: Icterohaemorrhagiae; Coluna 4: Pomona; Coluna 5: Wolffi.

Figura 4 B: Testes realizados com gel de poliacrilamida 15%. Coluna 1: Padrão de massa molecular de proteína (em KDa); Coluna 2: sorovarietades Hardjobovis; Coluna 3: Icterohaemorrhagiae; Coluna 4: Pomona.

A PME de massa molecular estimada em 22 KDa (Loa22), que aparece em todas as sorovarietades de leptospiros aqui estudadas, tanto nos géis corados com nitrato de prata quanto nos testes de Western blot é citada por Lafetá et al (2008) como a mais evidente em gel bidimensional para determinação das PME da *L. interrogans* sorovarietade Hardjo subtipo hardjoprajitno. Também está presente na

membrana externa de amostras dos sorogrupos Grippityphosa, Icterohaemorrhagiae, Andamana, Autumnalis e Semarang (Biswas et al., 2005).

Cullen et al. (2002) identificaram a Loa22 por meio de eletroforese bidimensional como um importante constituinte da *L. interrogans*, sorovarietade Lai. Esta

proteína mostra-se conservada entre as sorovarietades patogênicas de *Leptospira* (Koizume e Watanabe, 2003) e possui papel fundamental na realização de uma apropriada colonização bacteriana junto ao hospedeiro. Amostras que tiveram o gene responsável pela sua síntese silenciado, não foram capazes de levar seu hospedeiro a apresentar sinais clínicos característicos da fase aguda da doença ou de levá-los à morte. Ainda sim um pequeno número de *Leptospiras* foi encontrado nos órgãos de eleição no hospedeiro após infecção experimental demonstrando que, apesar da importância da Loa22 no processo de colonização, há mais de uma PME envolvida nesta tarefa (Ristow et al., 2007).

Segundo Cullen et al. (2002) a LipL32 possui massa molecular próximo a 29 KDa após processamento pós traducional, sendo a proteína de maior expressão nos géis unidimensionais. Mesmos achados são também registrados por Lafetá et al (2009) em géis unidimensionais da *L. interrogans* Hardjo subtipo hardjoprajitno. A intensa coloração apresentada pela LipL32 nos géis de poliácridamida justifica-se já que esta é a lipoproteína presente em maior quantidade nas membranas externas de algumas sorovarietades já estudadas (Haake et al., 1991; Haake e Matsunaga, 2002; Lafetá et al., 2009). Nos testes de Western blot realizados aqui tiveram resultados diferentes dos encontrados por Biswas et al. (2005) e Lafetá et al. (2009), que ao reagirem proteínas de membrana externa com soros de pacientes humanos e de bovinos, respectivamente, infectados naturalmente, só detectaram reações fortes nas bandas de 29 KDa (LipL32) e de 45KDa. Há uma série de fatores que podem contribuir para tal diferença sendo que alguns deles possuem maior relevância: a quantidade de proteína utilizada em cada teste e as sorovarietades testadas. Quanto ao primeiro fator, nenhum dos dois autores cita a quantidade de PME que foi aplicado em cada coluna do gel de poliácridamida. No caso de Lafetá et al. (2009), a quantidade de proteínas aplicada em cada coluna foi padronizada de acordo com testes de Western blot sem fazer uso de uma metodologia de quantificação. O mesmo deve ter ocorrido com Biswas et al.

(2005), já que ele não cita a concentração de proteínas utilizada nos testes. Já em relação às sorovarietades testadas é sabido que há diferenças na adaptação de cada amostra ao seu hospedeiro e que estas diferenças podem gerar diferentes níveis de resposta imune a determinados antígenos. Ainda assim a LipL32, aqui representada tanto pelas bandas de 29 quanto pelas bandas de 32 KDa, mostrou-se antigênica e comum as sorovarietades testadas. Reafirmando sua importância na relação antígeno-hospedeiro durante a leptospirose.

A LipL36 caracterizada por Faine et al. (1999) está presente nas quatro amostras estudadas. Segundo diversos autores, esta proteína aparece principalmente em estudos de composição das PME extraídas de leptospiras mantidas em cultivos e está associada à diminuição da virulência (Haake et al., 1991; Faine et al., 1999; Lafetá et al., 2009). Neste trabalho, as amostras de leptospiras utilizadas são mantidas em cultivo, no laboratório, há bastante tempo, o que justifica a presença da LipL36 entre as PME extraídas das sorovarietades estudadas.

Ao contrário do que era esperado, a banda de massa molecular estimada em 45 KDa não foi evidente em todas as sorovarietades testadas. Apenas a amostra Hardjobovis apresentou esta proteína com clareza. A LipL45 foi citada por Lafetá et al. (2009) como presente e imunoreativa na ME da *L. interrogans* sorovarietade Hardjo subtipo hardjoprajitno e por Biswas et al. (2005) também como presente e imunoreativa nas MEs das sorovarietades Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Andamana, Autumnalis e Semarang, sendo duas destas sorovarietades comuns a este estudo. Não há estudos que quantificam a expressão da LipL45 na membrana externa das leptospiras, por isso é difícil precisar o motivo pelo qual as demais amostras testadas não a apresentaram em seu perfil.

A proteína de 48 KDa (LipL48) foi observada em todas as sorovarietades aqui estudadas, assim como a LipL41. Elas estão

entre as proteínas mais abundantes na membrana externa de leptospiros segundo Hsieh et al. (2005). A LipL41, também descrita por outros autores em várias sorovariedades de leptospiros (Biswas et al., 2005; Bomfim et al., 2005; Haake), parece desempenhar um papel importante na patogênese da leptospirose (Hsieh et al., 2005). Nos testes Western blot, a LipL 41 assim como a LipL 48 reagiram em todas as sorovariedades testadas. Segundo Haake et al. (1991), a LipL41 possui participação importante nos processos infecciosos causados pelas leptospiros e sua atividade é acentuada quando associada à OMPL1 (LipL31). Guerreiro et al. (2001) considera esta, e outras, como as de pesos moleculares de 32, 45 e 48 KDa, como marcadores da resposta humoral durante a infecção causadas por leptospiros.

Uma proteína de peso molecular estimado em 52 KDa, que pode ser a OMP52 (Hsieh et al, 2005), importante proteína com propriedade imunogênica, mostrou-se presente nas sorovariedades Hardjobovis e Pomona nos géis corados com nitrato de prata. Sendo que nos testes Western blot esta mesma proteína foi reagente em todas as sorovariedades. Segundo Hsieh et al (2005), a OMP52 encontra-se em todas as leptospiros patogênicas.

4.2 Etapa II - Clonagem e subclonagem do gene LipL32 da *L. interrogans* sorovariedade Hardjo subtipo hardjoprajitno

4.2.1 Análises dos sequenciamentos

Após cada etapa de clonagem no vetor TOPO TA, as UFCs transfectadas selecionadas tanto nas reações de PCR quanto nos ensaios de restrição tiveram o inserto do seu plasmídeo sequenciado e a sequência resultante analisada. Desta forma, escolheu-se um clone que conduzia um inserto 100% similar ao DNA molde. O blastn foi a ferramenta de análise mais utilizada nesta etapa do trabalho. As análises dos sequenciamentos dos insertos mostravam que as sequências inseridas possuíam 100% de similaridade com gene da LipL32. Prosseguiu-se com os testes de expressão segundo metodologia já descrita sem obtenção de sucesso.

Diante do insucesso decidiu-se realizar o sequenciamento da porção do plasmídeo pertencente ao sítio de multiclonagem. Através destes testes verificou-se que o plasmídeo de expressão pet 21 A havia sofrido algumas mutações, incluindo uma deleção, no sítio da enzima SacI localizado entre os sítios das enzimas EcoRI e a enzima que utilizamos Sall. Os sequenciamentos originados de um mesmo clone seguem na figura abaixo.

```

>BNL5
GCYTRATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAAATTCGCCCTTGTCGACAAATTTGGCTATCTCCGTTGCAC
CTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGTCTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGG
ACAAACGAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGTT
TAGTCGATGAAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTGGATTCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAAC
AGGCGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTCAAAGCGGCTACCCAGAGAAAAATCAATGCCACATTGG
TTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATGTCCGGCATTATGCCTGACCAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAAACAGTTCAAAAA
TGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCC
TCCAAAATCTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAATTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTATAAA
CCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTTCGTTGCATCTGTGGTCTGCTTTTCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAA
TCCTGAGAATTGCAAAACAGCTATCGCTGCTGAGAGTCAGTCGAMAGGCGATCAGCMACCTGCGCGTACTAGTGATCGAGCTCGGTACA
AGCTGGCGTATCATGGTCATAGCTGGTTTTCTGKKGAAATTTGTWTCGGCTCAMAATT
>BNL6
GTCTWRATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAAATTCGCCCTTGTCGACAAATTTGGCTATCTCCGTTGCAC
TCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGTCTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGG
GACAAACGAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGTT
TAGTCGATGAAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTGGATTCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAAC
CAGGCGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTCAAAGCGGCTACCCAGAGAAAAATCAATGCCACATTG
GTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATGTCCGGCATTATGCCTGACCAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAAACAGTTCAAAAA
TTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCC
CTCCAAAATCTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAATTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTATAAA
ACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTTCGTTGCATCTGTGGTCTGCTTTTCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAA
CTGAGATTGCAAAACAGCTATCGCTGCTGAGAGTCAGTCGAMAGGCGATCAGCMACCTGCGCGTACTAGTGATCGAGCTCGTACAGCTG
CGTAWCATGTCWAGCTGTTTTCTGKKGAAATTTGTWTCGGCTCAMAATT
>EK12029
GATGGATATCTGCAGAAATTCGCCCTTGTCGACAAATTTGGCTATCTCCGTTGCACCTTTTGAAGCATTACCGCTTGTGGTGTCTTC
GGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGACAAACGAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCT
ACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGTTTAGTCGATGAAACAAAAAGCATACTATCT
CTATGTTGGATTCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGAC
TTAGTAAGCGACGCTTCAAAGCGGCTACCCAGAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATGT
CGGCGATTATGCCTGACCAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAAACAGTTCAAAAAATGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTA
TAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACGATCTGAAAAACATC
GACACTAAAAAATTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTATAAAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTTCGTTGCAT
CTGTTGGTCTGCTTTTCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTGCAAAACAAGCTATCGC
TGCTGAAGAGTCAGTC

```

Figura 5. Resultados dos sequenciamentos do sítio de multiclonagem do plasmídeo pet 21A

Segundo o mapa do vetor pet 21A disponível no endereço digital: (<https://wasatch.biochem.utah.edu/chris/link/s/pET21.pdf>) entre os sítios das enzimas Sal I e da EcoR I deveria haver sete nucleotídeos sendo que seis deles formariam a seqüência do sítio da Sac I. Seria assim:

GAATTCGAGCTCCG**T**CGAC

Em itálico e grifado encontra-se o sítio de restrição da enzima EcoRI, em negrito encontra-se o sítio utilizado neste trabalho da enzima Sal I e entre estes dois sítios encontram-se sete nucleotídeos sendo que seis deles formam o sítio de restrição da enzima SacI.

Está assim:

GAATTCGCCCTT**G**T**C**GAC

As mutações ocorridas no plasmídeo pet 21A além de terem inutilizado o sítio da enzima de restrição SacI também alteraram a fase leitura do gene LipL32 tornando-o capaz de sintetizar uma proteína truncada ou ainda inserindo um códon de parada no meio da síntese protéica. A mutação foi confirmada ao se seqüenciar outros clones e a construção realizada no plasmídeo pet 21A foi descartada.

4.3 Etapa III - Planejamento da síntese do gene sintético LipL32 no plasmídeo pJexpress 404

Com a finalidade de se obter a proteína LipL32 de forma rápida decidiu-se por utilizar o gene da LipL32 sintetizado em plasmídeo de expressão com os códons otimizados para expressão em *E. coli*. A sequencia de aminoácidos utilizada foi

gerada a partir de seqüenciamentos obtidos anteriormente na etapa 3.8 deste trabalho.

4.3.1 Seqüenciamento do gene LipL32

A partir da análise de vários seqüenciamentos chegou-se à seqüência consenso do gene codificador da proteína LipL32 (figura) descrita abaixo:

```
ATTTTGGCTATCTCCGTTGCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCCTTCGGTGGTCTGCCAAGCC
TAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAAACGAAACCGTAAAAACGTTACTTCC
CTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGTTTTAGTCGATGGA
AACAAAAAAGCATACTATCTCTATGTTTGGATTCTGCGGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTT
CCCCAACAGGGCGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTCAAAGCGGCTACCCC
AGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGTACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATGTCGGCGATTATGCCT
GACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAAGCAAAACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATA
CTTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATC
TTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACT
ACCTATAAACCCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCCTTTCCACCAGGTATTC
CAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTC
ACACCACCACCACCACCAC
```

Figura 6. Código genético responsável pela síntese da proteína LipL32 em *Leptospira* spp.

Esta seqüência foi traduzida e a seqüência de aminoácidos resultante ao ser comparada com as seqüências de aminoácidos já depositas no GenBank (figura 7) apresentou 100% de homologia com muitas outras seqüências da LipL32 proveniente da *Leptospira interrogans* sorovariedade Hardjo subtipo *hardjoprajitno* assim como com as de outras espécies e sorovariedades.

A sequencia de animoácidos utilizada como modelo para a síntese do gene LipL32 foi

otimizada para expressão em *E. coli*. O código genético otimizado é constituído por códons preferenciais da *E. coli* sendo assim completamente diferente de qualquer sequencia já descrita segundo análise realizada no site do GenBank utilizando a ferramenta Blastn. Porém, a sua tradução em uma sequencia de aminoácidos possui 100% de similaridade com proteína LipL32. A figura 7 retrata tanto a sequencia de nuceotídeos otimizada quanto a sequencia de aminoácidos resultante da mesma.

```

1 ATGCATCACCACCACCATCACAGCAGCGGCGTCTGACTTGGGTACTGAGAATCTGTATTTTC
1 M H H H H H H S S G V D L G T E N L Y F
61 CAAAGCATGATCCTGGCCATCAGCGTGGCGCTGTTTGGCAGCATCACCGCCTGCGGTGCA
21 Q S M I L A I S V A L F A S I T A C G A
121 TTTGGTGGTCTGCCGAGCCTCAAAAGCTCATTTGTGTTGAGCGAGGATACGATTCCGGGT
41 F G G L P S L K S S F V L S E D T I P G
181 ACGAACGAAACCGTCAAAACCCCTGCTGCCATACGGCAGCGTCATTAACTACTACGGCTAT
61 T N E T V K T L L P Y G S V I N Y Y G Y
241 GTGAAACCGGGTCAAGCGCCTGACGGTCTGGTTCGACGGCAATAAGAAGGCGTATTACCTG
81 V K P G Q A P D G L V D G N K K A Y Y L
301 TACGTCTGGATTCCGGCTGTTATCGCGGAGATGGGTGTTTCGTATGATCAGCCCCGACGGGC
101 Y V W I P A V I A E M G V R M I S P T G
361 GAGATTGGTGAACCTGGTACGGTGATCTGGTGTTCGGATGCGTTCAAAGCACCCACCCCG
121 E I G E P G D G D L V S D A F K A A T P
421 GAAGAGAAGAGCATGCCGCATTGGTTCGACACCTGGATTTCGCGTTGAGCGTATGTCTGCG
141 E E K S M P H W F D T W I R V E R M S A
481 ATCATGCCTGACCAAAATCGCAAAGGCCGCAAAGCCAAACCGGTCCAGAAGCTGGACGAC
161 I M P D Q I A K A A K A K P V Q K L D D
541 GATGATGATGGCGATGACACTTACAAAGAAGAACGCCATAACAAGTACAATTCCCTGACC
181 D D D G D D T Y K E E R H N K Y N S L T
601 CGCATCAAGATTCCAAACCCACCGAAATCCTTCGATGATCTGAAAAACATCGATACGAAG
201 R I K I P N P P K S F D D L K N I D T K
661 AACTGCTTGTTCGTGGCTTGTACCGTATCAGCTTTACGACCTATAAGCCGGGTGAGGTT
221 K L L V R G L Y R I S F T T Y K P G E V
721 AAGGGCAGCTTCGTGGCGAGCGTTGGTCTGCTCTTTCCGCCAGGTATTCCGGGCGTACAG
241 K G S F V A S V G L L F P P G I P G V S
781 CCGTTGATTCACTCCAATCCGGAAGAACTGCAGAAGCAAGCGATCGCCGCTGAAGAGAGC
261 P L I H S N P E E L Q K Q A I A A E E S

```

Figura 7. Seqüência do gene LipL32 otimizada e sua tradução

A primeira metionina transcrita pelo códon de iniciação ATG precede a cauda de Histidina e o sítio de clivagem TEV. A segunda metionina (posição 23) precede a transcrição da seqüência de aminoácidos da proteína LipL32 em sua forma madura.

A seqüência de aminoácidos gerada quando comparada com os três grupos de sorovariedades separados por Luo et al (2010) com base em três seqüências de aminoácidos diferentes da LipL32 foi similar ao grupo composto pelas sorovariedades: *L. interrogans* Lai amostra lai, sorovariedade Pyrogenes amostra tian, sorovariedade Pomona amostra Luo, sorovariedade Lin amostra lin 6, sorovariedade Paidjan amostra L37, sorovariedade Canicola amostra lin, sorovariedade Automnalis amostra lin 4, sorovariedade Australis amostra 65-9 e *L. borgpetersenii* sorovariedade Mini amostra nam 10. O

segundo grupo foi composto apenas por uma amostra de *L. interrogans* e o terceiro grupo por amostras de *L. borgpetersenii*. A variabilidade que ocorre no gene LipL32 não parece estar diretamente relacionado a espécie de *Leptospira* já que a mesma espécie pode apresentar diferentes sequencias assim como a mesma sequencia pode estar em diferentes espécies. A exemplo, a sequencia de aminoácidos da LipL32 apresentada neste trabalho é idêntica à sequencia da *L. borgpetersenii* sorovariedade Mini amostra nam 10 apresentada por Luo et al (2010).

4.3.2 Transformação e testes de expressão

As duas linhagens celulares testadas BL21 C41 com pLysS e BL21 C43 foram transformadas com sucesso e expressaram a LipL32. No entanto a BL21 C43 foi

escolhida para dar continuidade aos trabalhos já que esta é considerada de mais fácil manipulação em relação a C41 com pLysS. Todos os demais testes de expressão que foram realizados tiveram resultados idênticos. Ou seja, não houve variação na concentração da LipL32 expressada ao se alterar a UFC, a concentração de IPTG ou a temperatura. Logo, as condições estabelecidas com padrão foram cultivo a 36,5°C, agitação de 250 rpm e indução realizada com 1 mM de IPTG.

Segundo Hannig e Makrides (1998), uma expressão de proteína heteróloga em *E. coli* deve atingir de 10 a 30% das proteínas totais expressadas pelas células para ser considerada satisfatória. Em nossos resultados a dificuldade de visualização da proteína LipL32 em SDS-PAGE quando comparamos o lisado total de *E. coli* não induzida com o lisado total de *E. coli* induzida evidenciou que a LipL32 não foi expressa em níveis satisfatórios. Outros

autores (Dey et al., 2004 e Luo et al., 2010) já utilizaram a *E. coli* para expressar a LipL32 com sucesso, no entanto em nenhum dos trabalhos citados há caracterização dos níveis de expressão. Os níveis de expressão obtidos neste trabalho tanto podem ser devido a características do plasmídeo utilizado, principalmente do gene promotor, T5, quanto a uma incompetência da célula escolhida ou ainda, a uma combinação destes fatores. Com base nestes resultados recomenda-se que novos sistemas de expressão devem ser testados com a finalidade de se conseguir maiores quantidades da LipL32 como normalmente é desejado para aplicações futuras.

4.3.3 Purificação

A LipL32 foi purificada de acordo com o protocolo da coluna utilizada e foi eluída com imidazol a 250mM. O resultado da purificação foi visualizado em SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue (Figura 8).

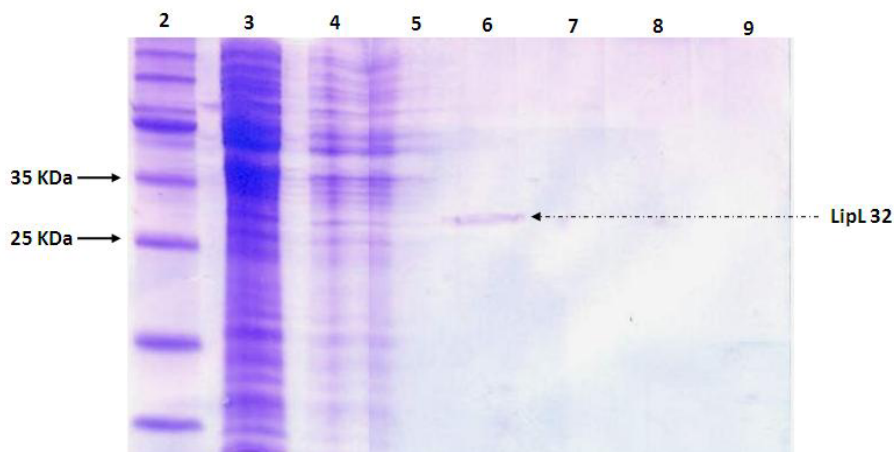


Figura 8. LipL32 purificada. Gel de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue corrido sob corrente elétrica de 150 v por uma hora. Coluna 2: padrão de peso molecular; coluna 3: lisado completo de *E. coli* BL21 C43 transformada com plasmídeo pJexpress 404 com gene LipL32 após quatro horas de indução com 1Mm de IPTG; coluna 4: fluxo recolhido da coluna FF cruda após hibridação; coluna 5: primeira lavagem da coluna com 5 mM de imidazol; coluna 6: primeira eluição com 250 mM de imidazol; coluna 8: segunda eluição com 250 mM de imidazol; coluna 9: terceira eluição com 250 mM de imidazol.

Alguns protocolos de purificação foram testados. Variando desde a forma de rompimento da *E. coli* até as concentrações de imidazol utilizada. A utilização de 8 M de uréia foi necessária para uma apropriada ligação da LipL32 à coluna de afinidade tendo sido ainda necessário a utilização de lise enzimática associada a sonicação. Um possível motivo da dificuldade encontrada na purificação deve ser os baixos níveis de expressão apresentados pelo sistema testado.

4.4 Etapa IV - Testes com a LipL32

4.4.1 Western blot com lisado de *E. coli* - Soro de coelho

As amostras de soro dos três coelhos hiperimunizados foram reagentes a proteína LipL32 recombinante. A clareza dos resultados (Figura 9) vistos neste teste

sugere a sua utilização como controle de expressão. A utilização de lisado completo de *E. coli* cujas proteínas nativas foram também reagentes as amostras de soro testadas foi considerada favorável para a visualização da expressão e marcação precisa do massa molecular da LipL32 recombinante. O controle negativo utilizado, lisado de *E. coli* não induzida não foi reagente. Testes feitos com estas mesmas amostras de soro pela técnica de AMR mostraram que todas as três amostras apresentavam títulos superiores a 12.000. No entanto, quando estes mesmos soros foram diluídos mais de 200 X para serem testados no Western blot eles deixavam de ser reagentes com a LipL32. Este fato está, provavelmente, relacionado ao aparecimento tardio das IgGs em relação às IgMs, anticorpos testados pelo AMR, e pelo próprio protocolo utilizado para a produção do soro hiperimune cuja data da coleta privilegia os anticorpos aglutinantes.

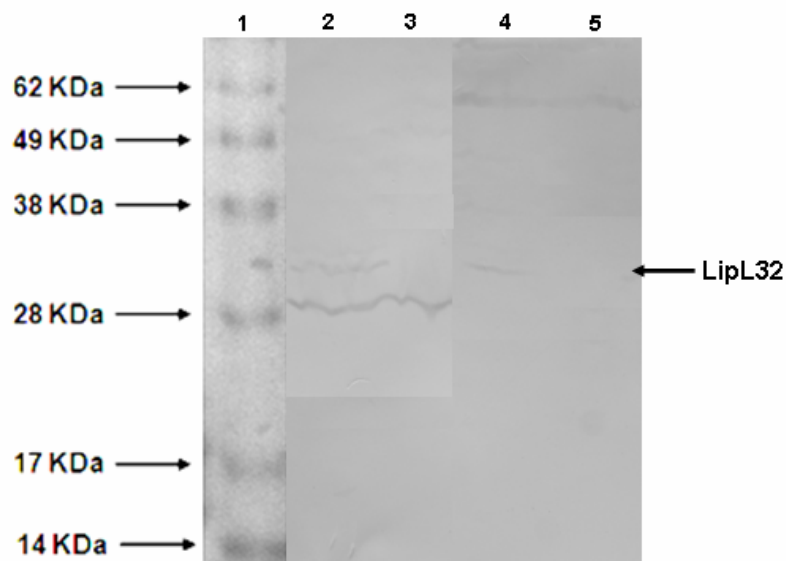


Figura 9. Western blot realizado com proteínas do extrato total de *E. coli* induzida e não induzida, separadas em gel de poliacrilamida.

Coluna 1: Padrão de massa molecular. Coluna 2: extrato total de *E. coli* induzida; Coluna 3: extrato total de *E. coli* não induzida. As membranas 1 e 2 foram testadas com soro do coelho experimental 1 previamente hiperimunizado. Coluna 4: extrato total de *E. coli* induzida; Coluna 5: extrato total de *E. coli* não induzida. As membranas 3 e 4 foram testadas com soro do coelho experimental 2 previamente hiperimunizado. Todas as membranas foram provadas com antiovelho Sigma conjugado com peroxidase diluído 1000 X e reveladas com DAB FAST (Sigma, D4293).

Lafetá et al (2009) ao analisarem membranas de Western blot feitas com proteínas de membrana externa da *L. interrogans* sorovariedade Hardjo subtipo hardjoprajitno provadas com soro de coelhos hiperimunizados constaram que uma proteína com massa molecular próximo a 29 KDa (LipL32) reagiu claramente com o soro dos coelhos hiperimunizados. Mas que, no entanto, a reação mais intensa na membrana ocorria entre as bandas de peso molecular iguais a 14 e 22 KDa. Esta mesma reação também foi percebida por Brown et al. (1991). Tais resultados somados aos trabalhos já publicados a cerca da importância de outras proteínas de membrana externa tais como a Loa22 (Ristow et al., 2007), OmpL1 e LipL41 (Haake et al., 1999), HlyX (Hauk et al., 2005) podem nos levar a questionar a eficiência de uma vacina formulada com um único antígeno. Tanto Haake et al., (1999) e HlyX et al. (2005) tiveram resultados de prevenção da infecção potencializados ao combinarem mais de um antígeno protéico.

Luo et al (2010) testaram uma combinação de três antígenos, LipL21, LipL32, LipL41 e células de leptospira inativadas, para vacinar porcos da Guiné e posteriormente desafia-los. Obtiveram taxas de imunoproteção variando entre 25% e 91% quando apenas antígenos isolados foram testados e 100% de proteção quando se utilizou bacterina em combinação com os antígenos protéicos. No entanto, nos exames histopatológicos realizados nos animais sobreviventes demonstraram a presença de leptospira nos rins de todos os animais que haviam sido vacinados com diferentes combinações de LipLs recombinantes e apenas os animais que receberam células de leptospira morta em combinação com os demais antígenos não apresentavam leptospira em nenhum dos órgãos examinados. Estes resultados nos levam a perceber a importância da presença dos antígenos não protéicos nas vacinas e a reavaliar a possibilidade de haver uma vacina eficaz feita apenas com antígenos protéicos. Quando analisamos os resultados dos testes de Western blot obtidos neste trabalho percebemos que apesar da LipL32 ter se mostrado antigênica, proteínas da *E.*

coli, organismo comensal nos coelhos, apresentaram reações tão ou mais fortes do que aquelas reações observadas para a LipL32. Logo percebemos que, muito provavelmente, a LipL32 sozinha seria insuficiente para conter uma infecção como até agora todos os imunógenos testados por outros autores, Haake et al., (1999), Luo et al. (2010), o foram. Além disso, os testes desafio são capazes de provar a eficiência de uma vacina que proteja contra os sinais clínicos característicos da fase aguda da leptospirose, mas não contra os sinais clínicos da fase crônica, tão importante na pecuária e na qual ocorrem os problemas relacionados à fertilidade das fêmeas acometidas.

4.4.2 Testes de Western blots realizados com LipL32 recombinante purificada e com soro de bovinos

Os nove soros de bovinos positivos para leptospirose no exame de AMR reagiram positivamente com a LipL32 nas membranas de nitrocelulose. Enquanto o soro negativo testado não reagiu (Figura 10). Este resultado possui similaridade com o resultado encontrado por Bomfim e colaboradores (2005) que ao testarem soros de 1:50 bovinos em um teste de ELISA indireto utilizando a LipL32 encontraram 100% de similaridade com o teste de AMR. No caso deste trabalho não houve a intenção de padronização de um teste por isso o número de amostras de soros bovinos testado é bem inferior ao utilizado pelos autores citados acima. Aqui a intenção foi provar que a LipL32 produzida a partir de um gene sintético mantém sua antigenicidade frente ao soro de bovinos naturalmente infectados. Dey et al. (2004) não encontraram 100% de relação entre os resultados do exame de AMR quando testaram soros de cães. Mas ainda sim, encontraram um alto nível de concordância entre o AMR e o ELISA padronizado com a LipL32. Por outro lado, Biswas et al. (2005) obtiveram resultados semelhantes com os aqui encontrados ao testarem soros de humanos com leptospirose confirmada durante um surto da doença. Segundo estes autores as únicas proteínas que reagiram nos testes de Western blot foram a LipL32 e

a LipL45, o que foi também demonstrado por Lafetá et al. (2009) ao encontrarem resultados semelhantes ao testarem soros de bovinos naturalmente infectados com as proteínas da membrana externa da *L. interrogans* Hardjo subtipo hardjoprajtino. Aqui, assim como ocorreu nos testes com soros de coelhos hiperimunizados não houve nenhuma reação exacerbada. As membranas se coraram discretamente na altura da banda esperada com os soros diluídos 1:50 vezes. Quando se aumentava esta diluição os soros deixavam de reagir. Mais uma vez o título reagente encontrado no Western blot se mostrou inferior aos títulos encontrados no AMR, que variavam entre 400 e 1:600. Os altos títulos de anticorpos aglutinantes comumente

encontrados nos soros testados, além de demonstrar que aquele animal foi infectado ou reinfectado recentemente, o que bem comum dentro de um rebanho, também podem demonstrar a importância destes anticorpos no combate a leptospirose. Uma vez que os o Western blot investiga IgG e o exame de AMR examina IgM uma proposta é que novos experimentos que também pesquise IgM sejam incluídos nos testes de novos candidatos antígenos e novos experimentos sejam realizados tanto com o objetivo de testar a capacidade protetora deste antígeno quanto com o objetivo de testar novos adjuvantes que sejam capazes de aumentar a resposta imune dos animais teste a antígenos protéicos.

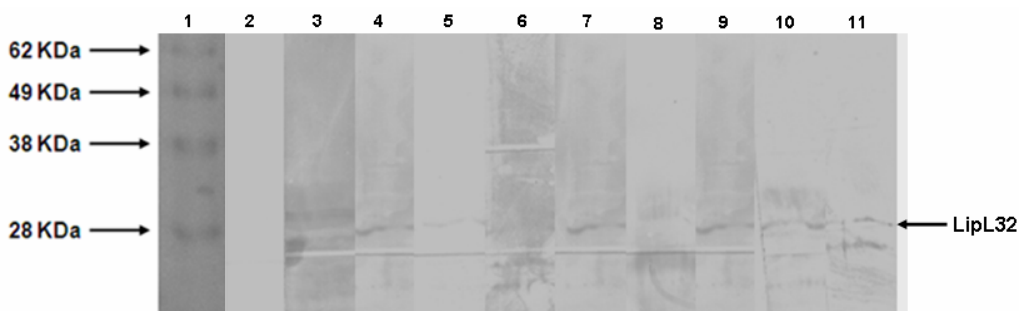


Figura 10. Western blot realizado com a proteína LipL32 purificada, 32µg/coluna, separada em gel de poliacrilamida.

Membrana 1: Padrão de massa molecular (Sigma, código A5295). Membrana 2: LipL32 testada com soro negativo para leptospirose. Membranas de 3 a 11: LipL32 purificada testada com amostras de soro de bovinos positivos para Leptospirose. Todas as membranas foram incubadas com anticorpo anti IgG bovina Sigma conjugado com peroxidase diluído 2000 vezes e reveladas com DAB FAST (Sigma, D4293).

5. CONCLUSÕES

Os perfis protéicos das membranas externas referentes as quatro sorovariedades de *Leptospira* estudadas não são idênticos.

As proteínas Loa22, LipL32, LipL41, LipL45, PME52 e PME75 são comuns a todas as sorovariedades testadas.

Em todas as sorovariedades testadas às bandas que se coraram mais intensamente nos testes de Western blot podem ser consideradas bons candidatos a imunógenos.

A proteína LipL32 expressada em *E. coli* modificada mostrou-se antigênica frente ao soro de coelhos hiperimunizados e de bovinos naturalmente infectados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, V. E. M.; MOREIRA, E. C.; NAVEDA, L. A. B. et al. Freqüência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootecnia**, v.57, n 4, p.430-5, 2005.

BERTANI, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** p. 62:293-300, 1951.

BIMBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, **Nucleic Acids Research**, v.7, n.6, p. 1513-23, 1979.

BISWAS, D.; ROY, S.; VIJAYACHARI, P. et al. Comparison of immunoreactive proteins of commonly circulating serogroups of *Leptospira* in Andaman Islands, India, **Indian J. Med. Res.**, v.121, p.151-8, 2005.

BOMFIM, M. R. Q.; KO, A; KOURY M. C. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis, **Vet. Microbiol.**, v.109, p.89-94, 2005.

BROWN, J. A.; LeFEBVRE, R. B., PAN, M. J. Protein and antigen profiles of prevalent serovars of *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v.59, n.5, p.1772-77, 1991.

BROWN, R. A.; BLUMERMAN, S.; GAY, C. et al. Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo*. **Vaccine**, v.21, p.4448-58, 2003.

CULLEN, P. A.; CORDWELL, S. J.; BULACH, D. M. et al. Global analysis of outer proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai, **Infect. Immun.**, v.70, n.5, p.2311-18, 2002.

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

CULLEN, P. A., XU, X., MTSUNAGA, J., et al. Surfaceome of *Leptospira* spp., **Infect. Immun.**, v.73, n.8, p.4853-63, 2005.

CUNNINGHAM, T.M.; WALKER, E. M.; MILLER, J. N. et al. Selective release of *Treponema pallidum* outer membrane and associated polypeptides with triton x-114, **J. Bacteriol.**, v.170, n.12, p.5789-96, 1988.

DEY, S.; MOHAN, C. M.; KUMART, M. A. S. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis, **Vet. Microbiol.**, v.103, p.99-106, 2004.

ELLINGHAUSEN, Jr. H. C.; McCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **Am. J. Vet. Res.**, v.26, p.45-51, 1965.

FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C. **Leptospira and Leptospirosis**, 2 ed. Melbourne: MediSci, 1999. p. 272.

- FUKUNAGA, M. e MIFUCHI, I. Unique organization of *Leptospira interrogans* rRNA genes, **Journal of Bacteriology**, v. 171, p.5763-67, 1989.
- HAAKE, D. A.; WALKER, E. M.; BLANCO, D. R. et al. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar *grippotyphosa* during "in vitro" cultivation, **Infect. Immun.**, v.59, n.3, p.1131-40, 1991.
- GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B. et al. *Leptospira* proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infect. Immun.** , v.69, p.4058-68, 2001.
- HAAKE, D.A., CHAO, G., ZUERNER, R. L., et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection, **Infect. Immun.**,v.68, n. 4, p.2276-85, 2000.
- HAAKE, A D.; MATSUNAGA, J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. **Infect. Immun.**, v.70, p.6572-6582, 2002.
- HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M. et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and lipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infect. Immun.**, v.67, n. 12, p.6572-6582, 1999.
- HAAKE, D.A.; WALKER, E.M.; BLANCO, D.R. et al. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar *Grippotyphosa* during "in vitro" cultivation. **Infect. Immun.**, v.59, p.1131-40, 1991.
- HANNIG G., MAKRIDES S.C. Strategies for optimizing heterologous proteins expression in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 54-60, 1998.
- HAUK, P.; NEGRITTO, S.; ROMERO, E. C. et al. Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: Potentiation of activity by LipL32. **Bioch. Biophys. Res. Comm.**, v.333, p.1341-47, 2005.
- HYDE, F. W.; JOHNSON, R. C. Genetic relationship of lyme disease spirochetes to *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira* spp. **J Clin Microbiol.** n.20, v.2, p.151-54, 1984.
- HSIEH, W. J.; CHANG, Y. F.; CHIA-SUI C. et al. Omp52 is a growth-phase-regulated outer membrane protein of *Leptospira santarosai* serovar *shermani*. **FEMS Microbiol. Letters**, v.243, p.339-345, 2005.
- KRIEG, N. C., **Bergey' Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1984. v.1.
- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. **FEMS Microbiol. Letters**, v.226, p.215-219, 2003.
- LAFETÁ, B. N., SANTOS, S., SILVA, V. I., et al. Determinação do perfil protéico da membrana externa da leptospira interrogans sorovariedade Hardjoprajitno. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootecnia**, v.60, p.1301-06, 2008.
- LAFETÁ, B. N., CASTRO, E. C., SILVA, N. Protein and antigen profiles of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **Ciência Rural**, v. 39, p.2539-43, 2009.
- LEE, S. H.; Kim, K. A ; PARK, Y. G et al. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar *Lai*. **Gene**, v. 254, p. 19-28, 2000.
- LEVETT, P. N., *Leptospirosis Clin. Microbiol. Reviews*, v.14, n.2, p.269-326, 2001.
- LUO, D., XUE, F., OJCIUS, D. M., et al. Protein typing of major membrane lipoprotein from Chinese pathogenic *Leptospira* spp. and characterization of their immunogenicity, **Vaccine**, v. 28, p. 243-55, 2010.

NICHOLSON VM, PRESCOTT JF. Outer membrane proteins of three pathogenic *Leptospira* species. **Vet Microbiol** , v.36, p.123-138, 1993.

NUNES-EDWARDS, P. L.; THIERMANN A. B., BASSFORD, P. J. et al. Identification and characterization of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. **Infect. Immun.**, v.48, n.2, p.492-497, 1985.

PRLYA, C.G.; BHAVANI, K.; RATHINAM, S. R. et al. Identification and evaluation of LPS antigen for serodiagnosis of uveitis associated with leptospirosis. **J Med Microbiol.** n. 52, p. 667-73, 2003.

Proteomics Facility (<http://Sr.burnham.org/Sr/homepage/proteomics/coomassie.html>)
Acessado em 14.05.2009.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; McBRIDE, F.W.C. et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLOS Pathogens**, n. 7, p.894-903, 2007.

RYU, E. Rapid microscopic agglutination test for *Leptospira* based on 400X magnification of darkfield examination. **Taiwan J. Med. Anim. Husb.** n.17, p.1-9, 1970.

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

SHANG, E. S.; SUMMERS, T. A.; HAAKE, D. A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infect. Immun.**, v.64, p.2322-2330, 1996.

SONRIER, C.; BRANGER, V. M.; RUVOËN-CLOUET, J. P. et al. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. **Vaccine**, v.19, p.86-94, 2001.

TAHILIANI, P.; KUMAR, M. M.; CHANDU, D. et al. Gel purified lipL32: A prospective antigen for detection of leptospirosis. **J. Postgrad. Med.**, v.5, p.164-168, 2005.

VALVERDE, M. A, RAMÍREZ, J.M., MONTES DE OCA, L.G. et al. Arenal, a new leptospira serovar of serogroup Javanica, isolated from a patient in Costa Rica, **Infection, Genetics and Evolution** v.8, p. 529-33, 2008.

VASCONCELLOS, S. A; BARBARINI, J. O.; UMEHARA, O. et al. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. **Arq. Inst. Biol.**, v.64, p.173-87, 1997.