

Bárbara Nobre Lafetá

**Perfil Protéico da Membrana Externa da *Leptospira interrogans*
sorovariedade *hardjoprajitno***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Nivaldo da Silva

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2006

L162p Lafetá, Bárbara Nobre, 1979-
Perfil protéico da membrana externa de *Leptospira interrogans* sorovariedade
hardoprajitno / Bárbara Nobre Lafetá. –2006.
36 p. :il.

Orientador: Nivaldo da Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária
Inclui bibliografia

1. Leptospira – Identificação – Teses. 2. Proteínas da membrana – Teses.
3. Proteína – Eletroforese – Teses. I. Silva, Nivaldo. II. Universidade Federal de
Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 692

Assinaturas

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio incondicional e pelo eterno porto seguro que me proporcionam.

Agradeço a Herberth pelo amor que nos ajudou a superar dois anos de distância.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Nivaldo, pela paciência, dedicação e compreensão diante da minha inexperiência.

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

Agradeço à equipe do Laboratório de Engenharia Bioquímica da VALLÉE S/A pelo apoio e pela amizade ao longo desses quase quatro anos de parceria. E em especial ao Dr. Otto Mozzer pelo empenho em unir Universidades e empresas privadas beneficiando ambas as instituições e os alunos envolvidos neste processo.

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

Agradeço à equipe do Laboratório de Anaeróbios e Microbiologia Oral (ICB), por terem cedido-me o espaço e equipamentos para trabalhar. Além disso, por terem sido tão amigos, pacientes e prestativos nestes dois anos de trabalho. Agradeço em especial a Profa. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, ao Dr. Cláudio Galuppo Diniz, e as doutorandas Vânia Lúcia da Silva e Simone dos Santos .

Agradeço a Profa. Zélia Lobato, aos amigos Toninho e Nádia e ao Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine pela grande ajuda que me ofereceram durante a execução deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de curso pelo companheirismo e amizade nestes dois anos de e em especial à Elizangela por ter sido sempre uma grande amiga.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	10
2.1. Características das leptospiros	10
2.1.1. Classificação sorológica	10
2.1.2. Classificação genotípica	11
2.2. Fatores de virulência	12
2.3. Biologia molecular das leptospiros	13
2.3.1. Proteínas de membrana	13
2.3.2. Perfil eletroforético das proteínas de membrana da leptospira	14
2.4. Situação da leptospirose em bovinos, no Brasil e no mundo	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Local de realização dos experimentos	16
3.2. Amostra de <i>Leptospira interrogans</i> utilizada	16
3.3. Cultivos das amostras de leptospira	16
3.4. Extração de proteínas da membrana externa	16
3.5.1. Precipitação protéica com acetona	18
3.5.2. Eletroforese unidimensional SDS-PAGE	18
3.6. Eletroforese bidimensional	18
3.7. Coloração do gel	18
3.8. Produção do soro hiperimune	19
3.9. Testes de Western blot	19
3.9.1. Testes de Western blot utilizando soro hiperimune	19
3.9.2. Testes de Western blot utilizando soros de bovinos infectados	20
3.10. Determinação da massa molecular das proteínas de membrana de <i>L. hardjoprajitno</i>	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Eletroforese unidimensional das proteínas de membrana de <i>L. hardjoprajitno</i> ..	20
4.2. Análise do gel bidimensional	23
4.3. Análise dos testes de Western blot realizados com soro hiperimune de coelho	27
4.4. Análise dos testes de Western blot realizados com soros de bovinos infectados	32
5. CONCLUSÕES	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE TABELAS		
Tabela 1	Sorogrupos e algumas sorovariedades de <i>Leptospira interrogans</i> lato sensu...	11
Tabela 2	Genomospecies de leptospiros associadas aos sorogrupos, segundo a classificação genotípica	12
Tabela 3	Códigos relacionados às proteínas analisadas no gel bidimensional e suas massas moleculares correspondentes	27
Tabela 4	Códigos relacionados às proteínas imunorreagentes nos testes de Western blot com soros hiperimunes e suas massas moleculares correspondentes	29
LISTA DE FIGURAS		
Figura 1	Esquema da extração da membrana externa da <i>L. interrogans</i>	17
Figura 2	Gel unidimensional das proteínas de membrana externa da <i>Leptospira interrogans</i> sorovariedade <i>hardjoprajitno</i>	21
Figura 3	Gel bidimensional das proteínas de membrana externa da <i>Leptospira interrogans</i> sorovariedade <i>hardjoprajitno</i>	25
Figura 4	Testes de Western blot realizados com soro hiperimune de coelho	29
Figura 5	Testes de Western blot realizados com soros de animais naturalmente infectados	33

LISTA DE ABREVIATURAS

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

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar o perfil das proteínas da membrana externa (PMEs) da *Leptospira interrogans* sorovariedade *hardjoprajitno* por meio da eletroforese uni e bidimensional e testes de Western blot. Foram utilizadas técnicas de extração da membrana externa com Triton x114 e precipitação das proteínas com acetona. As imagens foram analisadas pelo programa de computador Gel-Proanalyze 3.1. (MediaCybernetics®) para determinação da massa molecular das proteínas detectadas nos géis bidimensionais e nas membranas de nitrocelulose. Na eletroforese unidimensional foram visualizadas 14 bandas de proteína, sendo que quatro delas, de massas moleculares equivalentes a 63 KDa (LipL63), 47 KDa (LipL48), 29 KDa (LipL32) e 22 KDa (LipL22/Loa22), apresentaram-se como os principais componentes das proteínas de membrana externa. Nos géis de eletroforese bidimensional foram visualizadas 35 bandas de proteínas que predominam na membrana externa dessa leptospira, sendo que cinco delas se destacaram como de maior intensidade: 22,54 KDa (LipL22), 30/26 KDa (LipL32), 34,41 KDa (PME34), 42,75 KDa (LipL41) e 58,59 KDa (LipL63).. A eletroforese bidimensional mostrou-se com maior poder de resolução para separação das PMEs em comparação com a eletroforese unidimensional. Os testes de Western blot realizados com soros de coelhos hiperimunizados identificaram nove proteínas reagentes nos soros dos coelhos de massas moleculares de 51,1 KDa, 36 KDa, 27 KDa, 24,5 KDa, 20,5 KDa, 17,7 KDa e 14 KDa. Em soros de bovinos apenas duas proteínas modularam a resposta imune desses animais com pesos aparentes de 47 KDa (Pme45) e 29 KDa (LipL32). A diferença encontrada nos resultados dos soros de bovinos naturalmente infectados em relação aos resultados encontrados nos soros dos coelhos hiperimunizados podem ser atribuídas às diferenças de patogenicidade das amostras de Leptospiras que infectaram esses animais. As amostras que infectaram os bovinos estavam se mantendo na natureza, enquanto as amostras que foram utilizadas para produzir o soro hiperimune tem sido mantidas em laboratório a muito tempo.

Palavras-chave: *Leptospira interrogans hardjoprajitno*, proteínas de membrana, eletroforese bidimensional e Western blot.

ABSTRACT

Outer membrane proteins (OMPs) were isolated from *Leptospira interrogans* serovar *hardjoprajitno* using Triton X114, precipitated with acetone, and separated by electrophoresis 2-D and SDS PAGE and resolved by western blot. Gel migration patterns were compared using image analysis of 35 gel-purified proteins. Among the proteins identified by this approach included the outer membrane lipoproteins LipL22/Loa22, LipL32, Omp34, LipL41 and LipL63. The SDS PAGE identified 14 protein profiles in total. The major leptospiral OMPs were 63 KDa (LipL63), 47 KDa (LipL48), 29 KDa (LipL32) and 22 KDa (LipL22/Loa22). The results by western blot showed that antiserum from experimentally infected rabbits and naturally infected bovine evidenced different protein patterns. The outer membrane proteins of 51,1 KDa, 36 KDa, 27 KDa, 24,5 KDa, 20,5 KDa, 17,7 KDa and 14 KDa were principally detected by rabbit antibody. In contrast, two leptospiral OMPs of 47 KDa (Omp45) and 29 KDa (LipL32) were detected in significantly greater amounts using bovine serum. These findings suggested differences as determined by patogenicity and protein structure of *L. interrogans* serovar *hardjoprajitno*.

Key word: *Leptospira*, outer membrane protein, electrophoresis, western blot

1. INTRODUÇÃO:

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição mundial. Em animais, sua importância econômica está relacionada aos prejuízos nos sistemas de produção da pecuária leiteira e de carne, principalmente em bovinos, decorrentes dos problemas reprodutivos. Abortos e mortalidade embrionária, nascimento de bezerras fracas ou prematuros, assim como natimortalidade e mastites, são os quadros mais frequentes.

Leptospiras patogênicas estão distribuídas na natureza sob a forma de sorovariedades (aproximadamente 230), o que reflete em sua capacidade para sobreviver no ambiente e nos túbulos renais dos animais portadores com diferentes graus de patogenicidade e imunogenicidade. Entre as sorovariedades, a *Leptospira interrogans* sorovariedade *hardjoprajitno* apresenta-se como o principal agente da leptospirose bovina em diferentes países, inclusive no Brasil.

A existência de tantas sorovariedades está atribuída à estrutura dos lipopolissacarídeos (LPS) que compõe a membrana externa desta bactéria (Faine et al., 1999). Estas diferenças se refletem nas medidas de controle desta doença, baseadas no diagnóstico e, principalmente, na imunização dos animais com bacterinas comerciais, posto que na leptospirose a imunidade é humoral e relativamente sorovariedade específica. Ao contrário dos LPS, proteínas encontradas na membrana externa (PME) das leptospiras mostram-se conservadas entre as sorovariedades.

Baseando-se na conservação dos antígenos protéicos das leptospiras as pesquisas científicas vêm focando esforços na busca por antígenos protéicos capazes de prevenir a leptospirose de forma mais eficaz. Nesse sentido, o conhecimento sobre os perfis protéicos das membranas externas das leptospiras irá contribuir para estudos epidemiológicos desta doença e em seus processos de diagnóstico e de imunização.

Apesar da conhecida importância da leptospirose em nosso País, existem poucos estudos sobre a caracterização do perfil protéico das leptospiras, especialmente da *L. interrogans* sorovariedade *hardjoprajitno*.

O presente trabalho tem como objetivo verificar o perfil protéico da membrana externa da *L. interrogans* sorovariedade *hardjoprajitno* por meio das técnicas de eletroforese uni e bidimensional e do teste de Western blot, a fim de identificar as proteínas predominantes e imunomodulante nesta sorovariedade.

2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

2.1 Características das leptospiras

As leptospiras patogênicas, espiroquetas Gram negativas, são os agentes etiológicos da leptospirose. Estas bactérias possuem conformação helicoidal, medindo aproximadamente 0,1µm de diâmetro e 10µm de comprimento, contendo uma ou ambas terminações das células curvadas, dois flagelos periplasmáticos por célula e 18 ou mais espirais direcionadas para a direita. São móveis, aeróbicas e se coram fracamente com corantes de anilina. As leptospiras podem ser visualizadas em microscópio equipados com condensador de campo escuro ou com contraste de fase. Seu tempo de geração é de aproximadamente 10 horas. Não há como diferenciar visualmente cada uma das espécies do gênero (Krieg, 1984).

Atualmente, há duas classificações vigentes para o gênero *Leptospira*; uma mais antiga, baseada em sorologia e outra atual, em bases genotípicas. É crescente a tendência mundial para utilização da classificação genotípica (Levett, 2001).

2.1.1. Classificação sorológica

Conforme a classificação sorológica, o gênero leptospira está dividido em duas espécies, *L. interrogans*, compreendendo todas as amostras patogênicas e *L. biflexa*, contendo as amostras isoladas do ambiente

(Faine et al., 1999), ambas espécies divididas em numerosas sorovariedades definidas por testes de soro aglutinação (Johnson e Faine, 1984).

Cerca de 60 sorovariedades são descritas para *L. biflexa*. Estão relatadas, aproximadamente, 230 sorovariedades da

espécie *L. interrogans*, segundo a classificação sorológica (Koizumi, 2003), divididas em grupos e sorogrupos (Tabela 1). Embora os sorogrupos não expressem proximidade genética, eles são importantes para estudos epidemiológicos (Levett, 2001).

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

Sorogrupos	Sorovariedades
Icterohaemorrhagiae	<i>icterohaemorrhagiae, copenhageni, lai, zimbabwe</i>
Hedomadis	<i>hebdomadis, jules, kremastos</i>
Autumnalis	<i>autumnalis, fortbragg, bim, weeransinghe</i>
Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>
Bataviae	<i>bataviae</i>
Grippotyphosa	<i>grippotyphosa, canalzonae, ratnapura</i>
Canicola	<i>canicola</i>
Australis	<i>australis, bratislava, lora</i>
Pomona	<i>pomona</i>
Javanica	<i>javanica</i>
Sejroe	<i>sejroe, saxkoebing, hardjo</i>
Panamá	<i>panama, mangus</i>
Cynopteri	<i>cynopteri</i>
Djasiman	<i>djasiman</i>
Sarmin	<i>sarmin</i>
Mini	<i>mini, geórgia</i>
Tarassovi	<i>tarassovi</i>
Ballum	<i>ballum, aroberea</i>
Celledoni	<i>celledoni</i>
Louisiana	<i>louisiana, lanka</i>
Ranarum	<i>ranarum</i>
Manhao	<i>manhao</i>
Shermani	<i>shermani</i>
Hurstbridge	<i>hurstbridge</i>

2.1.2- Classificação genotípica

A classificação fenotípica das leptospiplas está sendo substituída pela classificação

genotípica, que inclui nos genomos espécies (Tabela 2) todas as sorovariedades de *L. interrogans* e *L. biflexa* (Pérolat et al., 1998; Brenner et al., 1999; Levett, 2001).

Tabela 2. Genomospécies de leptospiiras 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. weilii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. alexanderi</i>
Hurstbridge	<i>L. fainei</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. inadaí</i>
Javanica	<i>L. weilii</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. weilii</i> , <i>L. inadaí</i> , <i>L. alexanderi</i>
Mini	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</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. weilii</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. weilii</i>
Sejroe	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. weilii</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. weilii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. inadaí</i>

Os genomospécies não correspondem às duas espécies conhecidas de leptospira (*L. interrogans* e *L. biflexa*), posto que sorovariedades patogênicas e não patogênicas podem ocorrer dentro da mesma espécie; está demonstrada a existência de múltiplas amostras da mesma sorovariedade dentre elas (Brenner et al., 1999; Ferseu et al., 1999).

Segundo Levett (2001) a reclassificação das leptospiiras segundo o genoma é taxonomicamente correta e servirá de base para futuras classificações. Salieta o autor que a classificação molecular é

problemática para os microbiologistas por causa da clara incompatibilidade com o sistema de sorogrupos do qual tem se servido clínicos e epidemiólogos por muitos anos. 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).

2.2 Fatores de virulência das leptospiiras

A leptospirose é o resultado da relação bilateral existente entre leptospira e

hospedeiro, sendo um processo dinâmico envolvendo tanto fatores relacionados ao agente quanto ao hospedeiro. Esta relação possui alto grau de complexidade fazendo-se necessário o estudo de seus fatores separadamente.

Em relação aos antígenos, o termo patogênico refere-se às propriedades genotípicas das leptospiros que podem ser ou não expressas; virulência refere-se a propriedades fenotípicas dos organismos, por meio das quais mudanças patogênicas podem ser efetuadas em um determinado hospedeiro e sob determinada condição. Estes fatores, se expressos, podem ser caracterizados e monitorados assim como seus efeitos. Por exemplo, a *L. biflexa* sorovariedade *patoc* não produz doença em nenhuma espécie animal, por isso se trata de uma leptospiro não patogênica. Ao contrário, a *L. interrogans* sorovariedade *icterohaemorrhagiae*, quando expressa seus fatores de virulência, pode causar doença grave ou levar seu hospedeiro a condição de portador. Todas as leptospiros patogênicas podem perder seus fatores de virulência sob determinadas condições, como grande período de manutenção em meios de cultivo, o que as torna relativamente não virulentas, mas nunca não patogênicas. A propriedade de virulência pode ser restabelecida por passagens dessa amostra em algum tipo de hospedeiro (Faine et al., 1999).

São descritas três tipos de proteínas, importantes para a patogenicidade e virulência dessas bactérias, ligadas à estrutura das proteínas de membrana (PME) das espiroquetas: 1) lipoproteínas; 2) proteínas de transmembranas; 3) PME periférica (Levett, 2001; Cullen et al., 2004).

Segundo Cullen et al. (2004), as PMEs de espiroquetas estão em posição de interação com o ambiente e contribuem com a patogenia por também interagirem com o sistema do hospedeiro. Em outras bactérias patogênicas a caracterização das proteínas da membrana externa tem permitido associar essas moléculas às diversas funções, incluindo aumento da expressão na presença de ferro, peptídeos resistentes

a antimicrobianos e multi resistência às drogas, resistência à bile, poros de difusão, adesão e invasão.

2.3 Biologia molecular das leptospiros

As leptospiros são filogeneticamente associadas às espiroquetas (Cullen et al., 2004), sendo que o genoma 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 a leptospiro 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).

2.3.1. Proteínas de Membrana

As leptospiros possuem em comum com outras 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 das espiroquetas é responsável pela interfase 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).

2.3.2. Perfil eletroforético das proteínas de membrana de leptospiros

Nunes-Eduards et al., (1985) realizaram o primeiro estudo com a finalidade de verificar a composição protéica da membrana externa das leptospiros. Na investigação, utilizaram amostra de *hardjoprajitno* e a técnica de marcação radioativa dos antígenos com metionina (S^{35}). Nove bandas (63; 55; 51,5; 41,5; 38; 36; 35,5; 33 e 21,5 KDa) foram identificadas como componentes da membrana externa.

Brown et al. (1991), após estudarem o perfil protéico por eletroforese unidimensional e Western blot das amostras de *L. hardjoprajitno*, *L. hardjobovis*, *L. balcanica*, *L. pomona*, *L. kemnewicki*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola* e *L. grippotyphosa*, concluíram que os antígenos solúveis em detergente, extraídos da membrana externa, possuem massas moleculares aparentes de 95, 60, 50, 42,7, 40, 38, 32 e 25 KDa. No entanto, nos testes de Western blot as bandas de massas moleculares iguais a 25, 32, 35 e 42,7 KDa coraram-se mais intensamente que as demais bandas.

Segundo Faine et al. (1999) a sobrevivência das leptospiros em organismos susceptíveis é mediada pela sua resistência às imunoglobulinas inatas, em tecidos fluidos e plasma. Esses anticorpos naturais podem ser aumentados a partir de infecções subclínicas ou invasões do hospedeiro por organismos não patogênicos. Os anticorpos nativos agem junto com o sistema complemento e com lisozimas para causar a lise das leptospiros, após o acoplamento a receptores expostos na superfície de sua membrana. Microrganismos não patogênicos são susceptíveis a esse sistema; patógenos virulentos são resistentes e patógenos não virulentos são sensíveis. Logo, percebe-se que alguns tipos de não virulência são resultados da aquisição, da expressão ou da exposição do

receptor, o qual determina esta condição de complementaridade com os anticorpos nativos. A proteína da membrana externa da leptospira (LipL36), aparentemente não expressada quando a bactéria está sob condições “in vivo”, pode ser tal receptor.

Selmo Alves et al. (2000), extraíram as proteínas de membrana da *L. interrogans* sorovariedade *pomona* e realizaram o seu seqüenciamento parcial. As seqüências parciais geradas pelas proteínas de 32, 40 e 45 KDa, tiveram similaridade de 95,2% com as proteínas da *L. interrogans* e 90,5% com a *L. kirschneri*, confirmando a conservação antigênica existente entre as diversas leptospiros.

Cullen et al. (2002) ao analisarem as proteínas da membrana externa da *L. interrogans* sorovariedade *lai*, frente às variações nas condições de cultivo, verificaram alterações passíveis de serem percebidas apenas pela eletroforese bidimensional. As proteínas de massas moleculares próximas a 36 e 50 KDa foram reguladas negativamente sob condições que simulam as condições encontradas em hospedeiros. Tais resultados sugerem que novas investigações devem ser feitas para verificar essa associação na regulação da expressão de acordo com a condição de cultivo. Após a análise dos pontos protéicos pela técnica de MALDI-TOF por MS (espectrofotometria de massa) foi constatado que as proteínas LipL32, LipL36 e LipL41 (já seqüenciadas), juntamente com a LipL48 (seqüência ainda não publicada) predominam na membrana externa da *L. interrogans* sorovariedade *lai*. Essas conclusões somente foram possíveis por meio da análise das seqüências de aminoácidos, uma vez que produtos de clivagens, originados das proteínas citadas anteriormente, apresentavam massas moleculares e pontos isoelétricos diferentes, quando comparados com as formas não degradadas das mesmas proteínas. Das 67 proteínas separadas pela eletroforese bidimensional, 21 apresentaram seqüências convergentes à seqüência original da proteína LipL32. Os autores observaram que a proteína LipL32 é o antígeno protéico imunodominante e mais abundante da

membrana externa da *L. interrogans* sorovariedade *lai* e que os eventos de clivagem constatados naquele trabalho deveriam passar por novas investigações a fim de serem esclarecidos.

Biswas et al. (2005), estudaram as proteínas de membrana externa de leptospiros utilizando as técnicas de eletroforese unidimensional e de Western blot. Seis amostras de leptospiros foram analisadas: D22, *moskva* V, AF61, CH 11, *Aut* N, e *patoc* I, pertencentes a cinco sorogrupos, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae*, *andamana*, *autumnalis* e *semaranga*. As análises foram realizadas utilizando gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e posteriormente o immunoblotting. Para o desenvolvimento da técnica de immunoblotting, utilizaram-se soros hiperimunes produzidos contra as proteínas recombinantes PME32 e flagelina A, soros de pacientes naturalmente infectados e soros hiperimunes produzidos com as amostras citadas acima. Os resultados sugerem que os principais componentes protéicos da membrana externa das seis amostras de leptospiros testadas são proteínas com massas moleculares de 67, 41, 35, 32, 28 e 22 KDa. As proteínas 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. Em praticamente todos os testes de Western blot realizados com extrato de células completas a proteína de massa molecular 32 KDa juntamente com a de 45 KDa foram imunodominantes nas seis amostras utilizadas.

A utilização das proteínas recombinantes da leptospiros esta sendo testada para diferentes finalidades. Dey et al. (2004) desenvolveram um teste ELISA para diagnosticar a leptospirose canina utilizando a proteína recombinante LipL32.

Bomfim et al. (2005) testaram a utilização da proteína recombinante LipL32 originada da

sorovariedade *copenhageni* como antígeno em um ELISA denominado rLipL32 IgG ELISA. Amostras de 150 soros de bovinos foram testados pela aglutinação microscópica rápida (AMR) quanto à presença de aglutininas anti-leptospiros; 83,3% das amostras foram positivas com títulos entre 1:100 e 1:1600. No ELISA, 83,3% das amostras foram positivas o que demonstra uma sensibilidade de 100% do teste em relação a AMR.

Hauk et al. (2005) expressaram e caracterizaram a hemolisina HlyX que possui indicativos de ser uma proteína intracelular que é exportada para o exterior da célula durante algum momento da infecção. A HlyX e a LipL32 foram testadas sozinhas e em associação quanto às suas atividades hemolíticas. Em ambos os casos, as duas proteínas mostraram possuir atividade hemolítica em eritrócitos humanos.

Hsiel et al. (2005), ao estudarem as características moleculares de grupos de leptospiros patogênicos e saprófitas identificaram um gene pertencente apenas ao grupo das leptospiros patogênicos. Após esta primeira etapa, estudos mais direcionados demonstraram que se tratava de um gene capaz de codificar uma PME com massa molecular de 52,6 KDa, denominada PME52. Foi verificado que esta proteína tem sua expressão aumentada na fase estacionária de crescimento. Os autores identificaram anticorpos contra a proteína PME52 em soros de pacientes humanos naturalmente infectados, demonstrando ser ela imunogênica. Apesar disso, a PME52 é expressa em baixos níveis e seu valor como fator de virulência e sua capacidade protetora ainda precisam ser estudados para serem realmente compreendidos.

2.4. Situação da leptospirose em bovinos, no Mundo e no Brasil

Estudos de prevalência demonstram que a *L. interrogans* sorovariedade *hardjoprajitno* é o principal agente da leptospirose bovina nos Estados Unidos, Inglaterra, Nova Zelândia, Austrália, Canadá e Argentina (Nunes-Edwards et al, 1985; Levett, 2001).

No Brasil, estudos mostram que a *L. hardjoprajitno* é a sorovariedade prevalente em estudos epidemiológicos. Vasconcellos et al. (1997) em levantamento soro epidemiológico, realizado em vários estados brasileiros, encontraram altos títulos sorológicos para as sorovariedades *L. hardjo*, *L. wolffi*, *L. pomona* e *L. grippotyphosa*. Homem et al., (2000), encontraram a *L. hardjoprajitno* em 61,2% dos rebanhos bovinos localizados no município de Uruará, Pará. Langoni et al., (2000), sugerem ser esta a sorovariedade prevalente em levantamento soro epidemiológico realizado no estado de São Paulo. Araújo et al. (2005), encontraram a maior predominância desta leptospira em estudo soro epidemiológico realizado em bovinos, em Minas Gerais, no período de 1980 a 2002. As freqüências de aglutininas anti *hardjo* (genótipo *hardjoprajitno*, amostra Norma), seguidas da *hardjo* (genótipo *hardjoprajitno*, amostra OMS), *L. hardjobovis* e *L. wolffi* foram significativamente mais elevadas em relação às demais sorovariedades. Segundo estes autores, o papel da *L. wolffi* na infecção de bovinos não está bem definido, já que não há registros de isolamentos de amostras desta sorovariedade a partir de casos clínicos de leptospirose em bovinos. A afinidade antigênica que a sorovariedade *wolffi* possui com as amostras *hardjo* (Norma, OMS e *hardjobovis*) é considerada um fator importante na análise dos dados estatísticos de prevalência, sugerindo que os índices de prevalência se devem a reações cruzadas nos testes de aglutinação microscópica rápida e não a sua real existência nos rebanhos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Pesquisa e Diagnóstico de Doenças Infecciosas, Escola de Veterinária, UFMG e no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), UFMG.

3.2. Amostra de *Leptospira interrogans* utilizada

Utilizou-se, em todo o trabalho, amostra de *L. interrogans* sorovariedade *hardjoprajitno* (OMS) cedida pelo Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária, UFMG.

3.3. Cultivo das amostras de leptospirose

As leptospirose foram cultivadas em sistema estático, a 30°C, utilizando-se o meio líquido EMJH (Ellinghausen e McCullough, 1965). Os cultivos foram iniciados com o inóculo correspondente a 10% do volume final do mesmo e foram interrompidos no sétimo dia de incubação. A concentração final foi estimada através de contagem direta em câmara de Petroff Hausser em microscópio equipado com condensador de campo escuro sendo, em média, 1×10^9 leptospirose/mL.

3.4. 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:

- foram utilizados três litros de cultivo de *L. interrogans* sorovariedade *hardjoprajitno* (OMS) com sete dias de crescimento. A cultura foi centrifugada a $8.000 \times g$ a 4°C, durante 10 min. e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuscitado em 50 mL de PBS pH 7,2 contendo 5 mM $MgCl_2$, por três vezes consecutivas. Posteriormente o pellet foi ressuscitado em 2 mL T.E. (10mM de Tris hidrocloreto - 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 $8.500 \times g$, a 4°C, durante 10 min. Após a separação do sobrenadante, o pellet 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 T.E., 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 fases detergente e aquosa foram separadas.

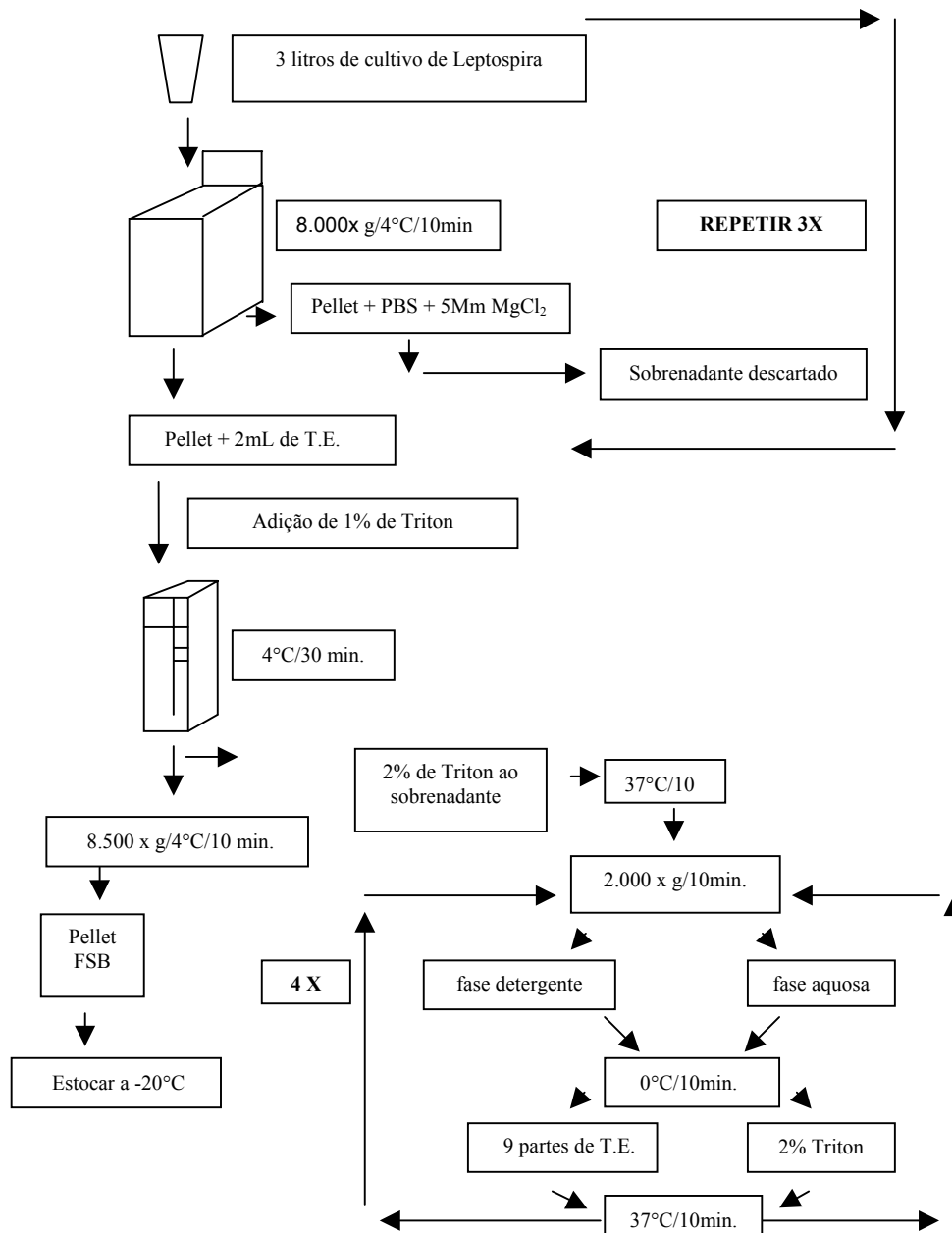


Figura 1: Esquema da extração das proteínas da membrana externa da *L. interrogans*

3.4.1. 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 (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.

3.5. Eletroforese unidimensional SDS – PAGE

Após o término da extração protéica todos os extratos foram testados quanto à presença de proteínas, utilizando-se a eletroforese unidimensional. Utilizou-se gel de poliacrilamida a 12% (p/v) aplicando-se 7 µL ou 9 µL de amostra por canaleta. As corridas foram realizadas a 150 volts com amperagem livre e a temperatura de 4°C utilizando-se o aparelho Mini-PROTEAN II (Bio-Rad).

3.6. Eletroforese bidimensional

Utilizaram-se tiras de gel imobilizado (Amersham Biosciences), com gradiente de pH de 4 a 7, medindo 13 cm de comprimento, segundo técnica descrita por Cullen et al. (2002).

As tiras de gel foram reidratadas em 300 µL de solução de reidratação completa 150 µL de solução de reidratação (2,4 g de uréia, 0,1 g de CHAPS, 100 µL de IPG Buffer, pH 7-4, 0,015 g de DTT em 5 mL de água ultrapura) e 150 µL de solução protéica. As duas soluções foram devidamente homogeneizadas. As tiras de gel ficaram imersas em solução de amostra completa durante 24 horas em suporte para reidratação (Amersham Biosciences). As

tiras de gel foram focalizadas no aparelho Multiphor II (Pharmacia Biotech) utilizando-se o seguinte gradiente de voltagem: 300 V, 2 mA, 3 horas e 30 minutos - 1000 V, 2 mA, 3 horas e 30 minutos - 2.500 V, 2 mA, 2 horas e 30 minutos - 3.500 V, 2 mA, 18 horas.

Ao final da focalização isoeletrica, as tiras de gel foram incubadas em solução de equilíbrio I (18 g de uréia, 5 mL de Tris, 15 mL de glicerol, 2 g de SDS, 0,25 g de DTT em 50 mL de água ultrapura) por 10 minutos, à temperatura ambiente sob leve agitação. Em seguida as tiras foram incubadas sob as mesmas condições na solução de equilíbrio II (18 g de uréia, 5 mL de Tris, 15 mL de glicerol, 2 g de SDS, 2,25 g de iodoacetamida, traços de azul de bromofenol em 50 mL de água ultrapura). As tiras de gel foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 15% (p/v) juntamente com o padrão de massa molecular (Promega, V8491). A corrida foi realizada a 45 mA, com voltagem livre.

3.7. Coloração do gel

O gel foi corado por nitrato de prata, seguindo o protocolo descrito abaixo. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente em mesa agitadora a 20 rpm (rotações por minuto).

O gel foi incubado duas vezes por 15 minutos em solução de fixação I (10% de ácido acético, 40% de etanol, 50% água deionizada) e em seguida foi incubado por 30 min. em solução de fixação II (75 mL de etanol, 10 mL de solução de tiosulfato de sódio 5% - p/v, 17 g de acetato de sódio, 1,25 mL de glutaraldeído em 250 mL de água deionizada). Logo após foi lavado três vezes com água deionizada por 15 minutos e foi incubado por 20 minutos em solução de prata (25 mL de solução de prata a 2,5% (p/v), 100 µL de formaldeído, em 250 mL de água deionizada). Após esta operação foi lavado por duas vezes com água deionizada e, posteriormente, incubado em solução de revelação (6,25 g de carbonato de sódio, 100 µL de formaldeído, 7 µL de tiosulfato de sódio a 5% - p/v) por aproximadamente

20 minutos. A solução de revelação foi então descartada e o gel incubado em solução de parada (3,65 g de EDTA em 250mL de água deionizada) por 10 minutos. Após descarte da solução de parada ele foi incubado três vezes, por cinco minutos, em água deionizada. Ao final do processo de coloração pela prata, o gel foi fotografado e seco entre duas folhas de papel celofane, presas a um suporte de acrílico. O tempo mínimo de secagem foi de 24 horas.

3.8. Produção do soro hiperimune

O soro hiperimune foi produzido utilizando-se três 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* sorovariedades *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* sorovariedade *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 ressuspenso 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 ressuspenso 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* sorovariedade *hardjo* (OMS) pela técnica de AMR (Ryu, 1970). Uma semana após a titulação os coelhos foram sangrados e sacrificados 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°C .

3.9. Teste de Western blot

Os testes de Western blot foram realizados utilizando-se géis unidimensionais, preparados de acordo com protocolo descrito no item 3.5.

3.9.1. Teste de Western blot utilizando soro hiperimune de coelhos

A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em Mini-Transbolt (Bio-Rad) a 150 volts por uma hora, em tampão de transferência (Tris 0,048 M, glicina 0,039 M, SDS 0,0013 M e 20% de metanol). Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada por uma hora a temperatura ambiente ou por toda noite a 4°C em solução de bloqueio [10 g de leite em pó desnatado, 40 μL de Tween 20 em 200 mL de TBS (Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5)]. Após a etapa de bloqueio, ela foi incubada por uma hora a temperatura ambiente com anticorpo primário (soro hiperimune produzido de acordo com protocolo descrito no item 3.4.) diluído 1:200 em TBS. A membrana foi lavada três vezes

por dez minutos com TBS e incubada por uma hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário marcado com peroxidase (Monoclonal Anti-Coelho IgG - Sigma) diluído 1:2000. A membrana foi lavada três vezes por 10 min. com TBS e revelada com DAB (Vector, SK4100).

3.9.2 Testes de Western blot utilizando soros de bovinos infectados

Testes de Western blot foram realizados com 12 soros de bovinos positivos testados pela técnica de AMR (Ryu, 1970), seguindo o protocolo descrito no item 3.9.1., excetuando as diluições utilizadas. Utilizou-se como controle negativo um *pool* de soros negativos testados para 17 sorovariedades, incluindo amostras das sorovariedades *hardjoprajitno* (OMS) e *hardjobovis*.

Os soros de bovinos positivos, naturalmente infectados, apresentavam títulos entre 1:100 e 1:1.600. O anticorpo secundário utilizado (IgG anti bovino marcada com peroxidase-Sigma) foi diluído 1.000 vezes. A membrana foi revelada com DAB (Vector, SK4100).

3.10. Determinação da massa molecular das proteínas de membrana de *L. hardjoprajitno*

Os géis bidimensionais e as membranas de nitrocelulose foram fotografados por câmara digital ao final de cada experimento. As imagens foram analisadas pelo programa de computador Gel-Proanalyze 3.1. (MediaCybernetics®) para determinação da massa molecular das proteínas detectadas nos géis bidimensionais e nas membranas de nitrocelulose.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Eletroforese unidimensional das proteínas de membrana de *L. hardjoprajitno*

A análise global das proteínas da membrana externa da *L. hardjoprajitno* por meio da eletroforese unidimensional (Fig. 2) mostrou a presença de 14 bandas, sendo que quatro proteínas apresentaram-se como os maiores componentes: 22 KDa, 29 KDa, 47 KDa e 63 KDa.

A banda de 22 KDa apareceu como um componente da PME dessa sorovariedade de leptospira, visualizada também por Koizumi e Watanabe (2003). Denominada por estes autores como Loa22, esta lipoproteína (LipL22) mostrou-se conservada entre as leptospiros patogênicas e imunomodulante quando testada em respostas sorológicas de camundongos convalescentes de leptospirose; está relacionada à patogenicidade das leptospiros. Ela foi também identificada por meio da eletroforese bidimensional como o segundo maior constituinte das membranas externas de *L. interrogans* sorovariedade lai (Cullen et al., 2002).

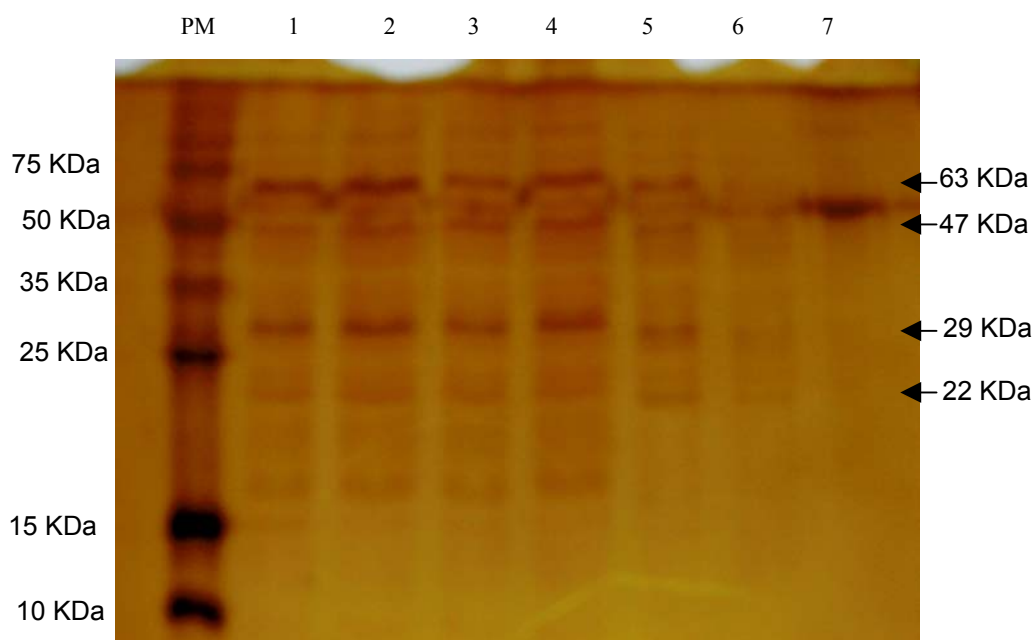
A proteína de 29 KDa apresenta-se como a principal componente das PMEs visualizadas nos géis unidimensionais, contrastando com os resultados da eletroforese bidimensional, onde a LipL22 (22 KDa), constituiu-se o maior componente. Segundo Cullen et al. (2002) esta proteína de 29 KDa pode ser uma forma degradada da LipL32, massa molecular de 32 KDa, uma importante lipoproteína citada como presente em grandes quantidades nas membranas externas das *L. interrogans* por Haake et al. (1993), Shang et al. (1995) e Haake e Matsunaga (2002).

Esta proteína de 29 KDa (LipL32) pode ser uma das principais proteínas da membrana externa de leptospiros, ainda não descrita para a sorovariedade *L. hardjoprajitno*, entretanto, presente em diferentes sorovariedades de *L. interrogans*, conforme assinalado por Cullen et al. (2002) e Cullen et al. (2004). Sua imunogenicidade está comprovada quando usada em testes de detecção de anticorpos em animais naturalmente infectados (Bomfim et al., 2005).

Uma proteína de massa molecular aparente igual a 47 KDa foi encontrada nos géis unidimensionais. De acordo com Cullen et al. (2002) esta PME se inclui no grupo de proteínas não descritas entre as famílias das PME das leptospiros, cuja função ainda não está determinada, sendo denominada de pL47/49. Haake e Matsunaga (2002) a

descrevem como uma nova lipoproteína encontrada exclusivamente nas PME's de leptospiros (LipL48). Em lisado de leptospiros Biswas et al. (2005) identificaram as proteínas imunorreativas massas moleculares iguais a 45 KDa. Pela proximidade entre as massas moleculares estimadas para esta PME e as possíveis degradações que podem ocorrer durante o processo de extração (Haake e Matsunaga, 2002), os resultados sugerem tratar-se da mesma proteína (LipL48), encontrada nos géis de eletroforese uni e bidimensionais.

A proteína que parece estar em maior quantidade nas eletroforeses unidimensionais tem massa molecular aparente próxima a 63 KDa e foi descrita anteriormente por Nunes-Edwards et al. (1985). Segundo Haake e Matsunaga (2002), esta é uma proteína de transmembrana, detectada em soros de animais imunizados. Nos géis de eletroforese bidimensional esta proteína não foi visualizada, entretanto, bandas de 58,59 KDa e 57,06 KDa foram encontradas, sendo provavelmente formas desnaturadas ou isoméricas da mesma.



Legendas: PM (padrão de peso molecular); canaletas de 1 a 7: amostras de proteínas extraídas da membrana externa da *L. interrogans* sorovariedade hardjoprajitno

Figura 2. Gel unidimensional das proteínas de membrana externa de *L. hardjoprajitno*

4.2. Análise do gel bidimensional

A contagem do número total de proteínas foi realizada visualmente observando-se 70 distintos pontos protéicos. O cálculo das massas moleculares dos 35 principais pontos protéicos foi feito com auxílio do programa Proanalyze 3.1. (MediaCybernetics®) (Fig.3 e Tab. 3). Para o programa analisar os géis bidimensionais, três linhas de análise foram criadas sobre os principais pontos protéicos, denominadas linhas de análise 2 (L2), 3 (L3) e 4 (L4), sendo que na linha 1 (L1) está o padrão de massa molecular. Neste trabalho é descrito, pela primeira vez, o perfil protéico da PME da *L. hardjoprajitno* por meio da eletroforese bidimensional. Até então, por meio desta técnica, o perfil protéico da membrana externa da *L. interrogans* sorovariedade *lai* está descrito por Cullen et al. (2002) e Cullen et al.(2005).

A análise global das proteínas da membrana externa da *L. hardjoprajitno* por meio da eletroforese bidimensional mostrou que três proteínas apresentaram-se com as maiores concentrações: 22,54 KDa (r10), 34,41 KDa (r5) e 42,75 KDa (r3). Pela proximidade entre as massas moleculares, estas três PMEs são similares às lipoproteínas LipL21, LipL32 e LipL41, descritas por Cullen et al. (2002), ao utilizarem a mesma metodologia.

A proteína que aparece em maior quantidade no gel se encontra na linha de análise L3 e possui massa molecular igual a 22,54 KDa (r10). Segundo Cullen et al. (2002) esta proteína ainda não está totalmente caracterizada, porém aparece como o segundo maior constituinte das membranas externas de *L. interrogans*. Por meio de eletroforese unidimensional ela foi denominada por Koizumi e Watanabe (2003) como Loa22, pertencente ao domínio OmpA. Segundo estes autores esta é uma lipoproteína conservada entre as leptospiros patogênicas e frente a qual foram detectados anticorpos em soros de camundongos convalescentes de leptospirose, havendo alta correlação entre

a presença de Loa22 e a patogenicidade das leptospiros.

A segunda proteína em ordem de concentração, r5, aparece tanto nas linhas de análise L2 e L3, como entre elas, apresentando massas moleculares iguais a 34,41KDa e 33,84 KDa, respectivamente. Pequenas diferenças de massas moleculares não são consideradas pelo programa informático, recebendo as duas proteínas o mesmo código e denominadas PME34.

Apesar da expressão das PMEs ser dependente de diferentes fatores ambientais, lipoproteínas de massa molecular de 34 KDa, não foram encontradas por Cullen et al. (2002), ao estudarem a expressão de proteínas de membranas de *L. lai*, cultivadas em diferentes condições. Não existem registros da existência de uma PME34 entre as sorovariedades de *L. interrogans*, entretanto, Haake et al. (1991), por meio da eletroforese unidimensional, detectaram uma quantidade significativa de um lipopolissacarídeo (LPS) de 33 KDa, de origem flagelar e com atividade antigênica, em amostras atenuadas de *L. interrogans* sorovariedade *grippityphosa*. Esta PME34 pode ser o mesmo polipeptídeo liberado pelo Triton X114, no processo de extração, descrito por aqueles autores, posto que são mínimas as diferenças entre as massas moleculares. Deve-se acrescentar que a amostra de *L. interrogans* sorovariedade *hardjoprajitno*, usada neste experimento, é também uma amostra atenuada, mantida em laboratório por muito tempo e que não passou por recentes passagens “in vivo”.

A proteína com massa molecular mais próxima a 32 KDa se encontra nas linhas L2 e L3, tendo massas moleculares estimadas em 30,08 KDa (r6) e 31,81 KDa (r6), respectivamente. Segundo Cullen et al. (2002), a membrana externa da *L. lai* possui 67 distintos pontos protéicos, número próximo ao encontrado na sorovariedade *L. hardjoprajitno*. Segundo esses autores, após a realização da espectrofotometria de massa, dos 67 pontos protéicos visualizados

em seus experimentos, 21 apresentaram seqüências de aminoácidos convergentes com a LipL32 e massas moleculares abaixo de 29 KDa (forma da proteína observada com o sinal N-Terminal removido). Nos resultados aqui expressados, dos principais 35 pontos protéicos que tiveram suas massas moleculares calculadas, 25 (71,42%) possuem massas moleculares abaixo de 29 KDa e, alguns deles, apresentam massas moleculares próximas às encontradas por Cullen et al. (2002) para as isoformas da LipL32, denominadas de LipL32.26; LipL32.24; LipL32.23a,b,c; LipL32.22; LipL32.16; LipL32.14a,b. Nesta denominação, o segundo número significa a massa molecular aproximada para essas isoformas.

As bandas de proteínas da membrana externa de *L. hardjoprajitno*, de 30,08 KDa e 31,81 KDa (r6), detectadas pelo programa a partir dos géis bidimensionais, permitem sugerir que elas podem ser similares às proteínas da membrana externa da sorovariedade *L. lai* descrita por Cullen et al. (2002). Assim, estas proteínas podem ser uma das principais proteínas da membrana externa da sorovariedade *L. hardjoprajitno* (ainda não descritas) ou mesmo ser a própria LipL32, encontrada em diferentes sorovariedades de *L. interrogans*, conforme assinalado por Tahiliani et al. (2005). Apesar das similaridades entre as proteínas encontradas, dessas duas sorovariedades, resultados conclusivos sobre a identidade das proteínas visualizadas nos géis da *L. hardjoprajitno* só devem ser obtidos mediante o seqüenciamento das mesmas.

Em relação às condições de crescimento, é conhecido que as leptospiros não expressam certas PMEs em determinadas temperaturas e níveis baixos de disponibilidade de íons férrico. As leptospiros utilizadas neste experimento cresceram em meio líquido, EMJH, à temperatura de 30°C, sendo fornecidas condições de expressar seus antígenos de membrana externa. As proteínas de 30,08 KDa e 31,81KDa (LipL32) não apareceram de forma tão abundante como detectado por Cullen et al. (2002) para a *L. lai*. Esta lipoproteína está associada à produção de

hemólise, mediante a expressão da enzima esfingomielinase (SphH), sendo responsável pelos quadros hemolíticos causados pelas leptospiros (Lee et al., 2000). Como a *L. hardjoprajitno* está mais associada a problemas reprodutivos, principalmente em bovinos, e causa menos quadros hemolíticos, a sua expressão, nesta espécie de leptospira, deve ser conseqüentemente menor.

Na região da linha de análise L2 e L3 existem pequenas bandas protéicas, denominadas de r7 e r8, cujas massas moleculares estão estimadas em 27,81 KDa e 26,44 KDa. Estas proteínas deixaram um forte arraste na parte alcalina do gel durante a focalização isoeletrica, sugerindo serem formas desnaturadas da LipL32.

LipL41 considerada como uma lipoproteína altamente conservada e imunomodulante para espécies de *L. interrogans* (Haake et al., 1999), não foi detectada na *L. hardjoprajitno*, pela eletroforese bidimensional. Em seu lugar foi encontrada uma PME de 42,75 KDa (r3), cuja massa molecular se aproxima à LipL41, descrita por Shang et al. (1996) e Cullen et al. (2002). Considerando-se as características desta proteína de transmembrana de leptospiros, as diferenças observadas em relação a massa molecular podem ser devidas às formas isômeras desta proteína ou ao modelo de determinação da massa molecular, posto que muitas determinações foram feitas de forma visual e não por recursos informáticos, como os usados neste trabalho. Por outro lado, as massas moleculares das PMEs podem ser alteradas em função do processo de extração que pode interferir na integridade da proteína extraída, ou a sua não desnaturação completa (Haake et al., 1991; Nicholson e Prescott, 1993; Cullen et al., 2002). Essas considerações fazem supor que a proteína de 42,75 KDa (r3) possa ser a LipL41, tendo em vista a descrição desta PME em diferentes sorovariedades de *L. interrogans*.

Nas linhas de análise L2 e L3 apareceram duas bandas de massas moleculares calculadas em 58,59 KDa e em 57,06 KDa (r1), respectivamente. Cullen et al. (2002)

encontraram proteínas de massas moleculares próximas às descritas neste trabalho. Estas proteínas, ainda não seqüenciadas, sugerem a existência de outros tipos de proteínas envolvidas nas estruturas externas das leptospiros. Uma PME de 63 KDa (LipL63) é descrita por Haake e Matsunaga (2002), como uma proteína de transmembrana das espiroquetas, principalmente entre as leptospiros, cuja função ainda não está conhecida, entretanto, está detectada em soros de animais imunizados. Pode-se considerar que as duas bandas de 58,59 KDa e 57,06 KDa descritas aqui, são componentes da LipL63, posto que durante o processo de extração e solubilização com Triton X114, ocorrem alterações estruturais nas PMEs das espiroquetas e, conseqüentemente, diminuição das massas moleculares. Salientamos que a determinação das massas moleculares foi realizada por programa informático,

enquanto que Haake e Matsunaga (2002) estimaram as massas moleculares por comparação aos marcadores de proteína utilizados.

A PMEL1 (LipL31), massa molecular de 31 KDa, é uma importante PME de transmembrana, citada como presente em pequenas quantidades nas membranas externas das *L. interrogans* (Haake et al., 1993; Shang et al., 1995) não foi identificada pela eletroforese bidimensional. Falhas para identificar a PMEL1 podem ocorrer devido a vários fatores, destacando-se o baixo nível de expressão dessa proteína (presente em pequenas quantidades entre as PMEs), a sua não solubilização no tampão ou por ela possuir um ponto isoelétrico fora da faixa de pH pesquisada (pH 4-7) pela técnica de eletroforese bidimensional usada neste experimento.

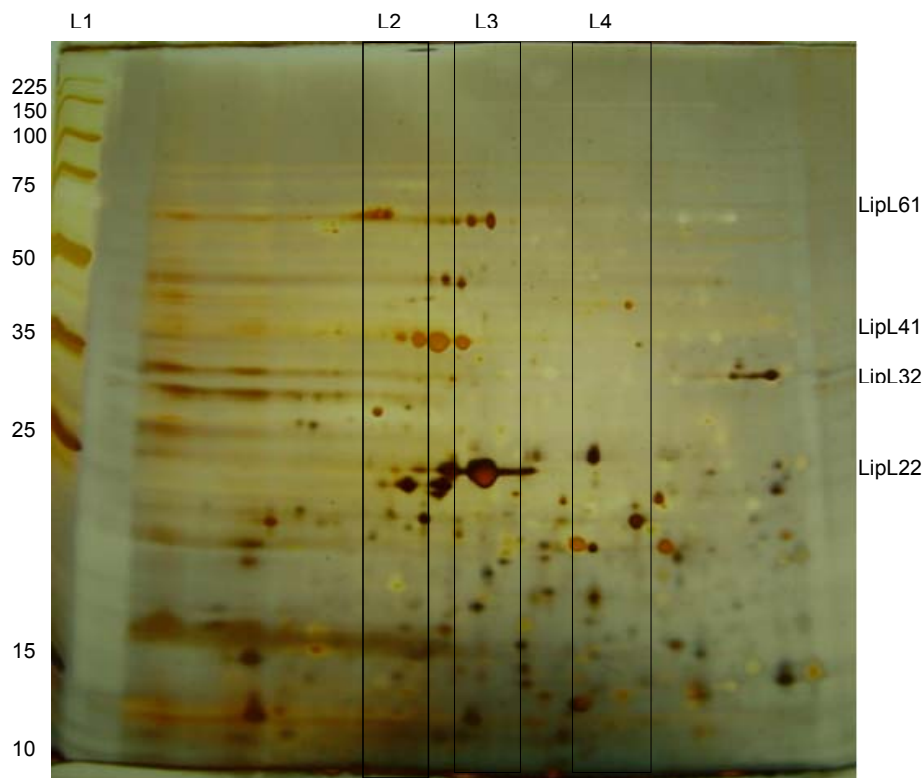


Figura 3: Gel bidimensional das proteínas de membrana externa da *Leptospira interrogans* sorovariedade *hadjoprajitno*

Tabela 3: Códigos relacionados às proteínas analisadas no gel bidimensional e suas massas moleculares correspondentes

Código	Linha de análise 2	Linha de análise 3	Linha de análise 4
r1	58,59	57,06	
r2		44,67	
r3	43,03	42,75	
r4		37,26	
r5	34,41	33,84	
r6	30,08	31,81	
r7	27,81		
r8	26,44		
r9		23,86	23,44
r10	22,70	22,54	22,62
r11	21,82		21,98
r12	20,46		
r13	19,74		
r14	19,46	19,46	19,19
r15			18,98
r16		17,99	
r17	16,69	16,578	16,87
r18	15,82		15,99
r19			15,43
r20	15,16		14,78
r21	14,11		

4.3. Análise dos testes de Western blot realizados com soro hiperimune de coelho

Soros hiperimunes de coelhos foram testados por Western blot e as imagens geradas foram analisadas pelo programa Gel-Proanalyze 3.1. (MediaCybernetics®) (Fig 4; Tab. 4). As bandas que se coraram mais intensamente possuem denominações e massas moleculares iguais a 35,5 KDa (r2), 27,7 KDa (r3), 24,4 KDa (r4), 21,08 KDa (r5), 17,76 KDa (r6) e 14,01 KDa (r8), estando localizadas em linhas de análise denominadas L2 e L3.

Segundo Brown et al. (1991), pela técnica de Western blot, a fração da membrana externa da amostra *L. hardjobovis*, solúvel em detergente, apresenta bandas comuns e imunorreativas com várias sorovariedades, com massa molecular estimada em 25KDa, 32 KDa, 35 KDa, 42,7 KDa e 44 KDa. Já a amostra de *L. hardjoprajitno* não apresenta as proteínas de massas moleculares iguais a 42,7 e 44 KDa. Nos resultados

apresentados aqui, duas bandas (35,5 KDa e 24,4 KDa) tem massas moleculares muito próximas as encontradas por Brown et al. (1991). E assim, como detectado por estes autores, aqui nenhuma banda com peso próximo a 42 KDa ou a 44 KDa foi reativa para a *L. hardjoprajitno*. A pequena diferença entre as massas moleculares das proteínas em comum, nos dois trabalhos, pode ser explicada pela diferença existente na forma de análise dos resultados posto que, aqueles autores não utilizaram programas de computador para calcular a massa molecular das proteínas reagentes, eles apenas estimaram valores aproximados. Por isso, a banda de 35,5 KDa, descrita neste trabalho, provavelmente corresponde a banda de 35 KDa, assim como a de 24,4 KDa à de 25 KDa. Pela técnica de Western blot pode-se deduzir que estas duas proteínas são imunomodulantes, contendo determinantes antigênicos tanto para as sorovariedades de

L. hardjobovis como para *L. hardjoprajtino*. Segundo Cullen et al. (2004) a PMEL1(LipL31) de massa molecular estimada em 31 KDa durante a extração sofre processo de desnaturação e assume massa molecular próxima a 25 KDa. Nesta linha de raciocínio, pode-se considerar que

a banda de proteína marcada de 24,4 KDa corresponde à LipL31, uma transmembrana presente em diferentes sorovariedades de *L. interrogans*. Esta proteína em associação com a LipL41 (41 KDa) é imunogênica quando utilizada em processos de imunização de hamster (Haake et al., 1999).

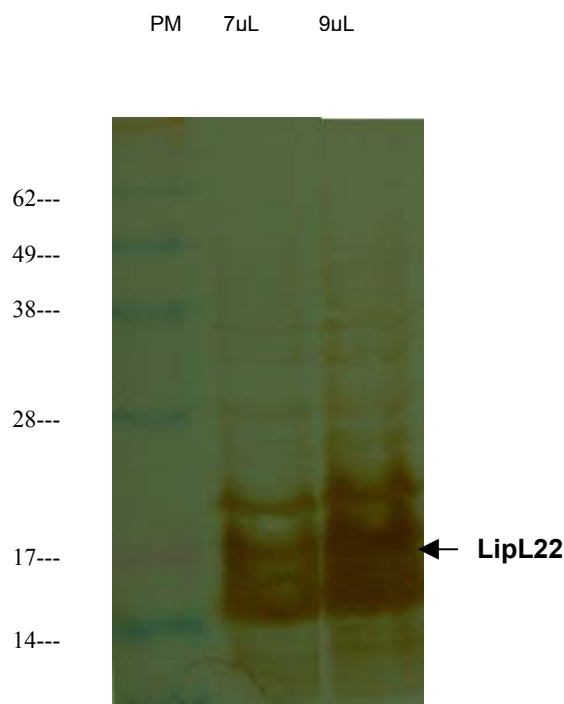


Figura 4. Teste de Western blot realizado com soro hiperimune de coelho

Tabela 4. Códigos relacionados às proteínas imunorreagentes nos testes de Western blot com soros hiperimunes e suas massas moleculares correspondentes

Códigos	Linha de análise 2	Linha de análise 3
r1		51,11
r2	35,50	36,06
r3	27,76	27,76
r4	24,46	25,00
r5	21,08	20,50
r6	17,76	
r7		15,82
r8	14,01	
r9		9,87

Em relação às diferenças de massa moleculares, a banda de 35 KDa descrita por Brown et al. (1991) pode ser o mesmo LPS de 33 KDa encontrado entre as sorovariedades de *L. interrogans* por Haake et al. (1991), por meio da eletroforese unidimensional, já que são mínimas as diferenças entre as massas moleculares. Estas diferenças devem ser trabalhadas, principalmente pela utilização de processos informáticos para determinação das massas moleculares das proteínas extraídas, assim como pela utilização de processos uniformes para extração das PME's.

Uma banda que se corou discretamente, localizada entre as bandas r2 e r3, nas duas linhas de análise, não teve sua massa molecular calculada pelo programa informático. Apesar de não ser possível este cálculo, pode-se estimar, por comparação com as bandas do marcador de massa molecular, que sua massa aproximada é de 32 KDa, sendo ela, provavelmente, a forma não degradada da LipL32 (Brown et al., 1991; Cullen et al., 2002).

Entre as bandas denominadas de r5, r6 e r8, houve uma forte coloração de fundo dificultando a leitura do teste. Por este motivo, foram feitas duas análises distintas dos resultados. Uma considerando a parte média das bandas na linha de análise 2 e outra considerando a parte superior das bandas, linha de análise 3. As demais bandas estavam bem definidas. A intensa coloração de fundo que ocorreu em todas as membranas nesses experimentos foi também observada por Brown et al. (1991), sendo considerada como uma característica nos testes de Western blot realizados com amostras do sorogrupo Sejroe, quando essas membranas reagem com soros contendo anticorpos contra leptospiros pertencentes a esse sorogrupo. Esta coloração de fundo pode ser decorrente da grande quantidade da proteína LipL22 na membrana externa da sorovariedade *hardjoprajitno* visualizada claramente no gel bidimensional (Fig.3).

Nos testes de Western blot a banda denominada r2, na linha de análise 3L, de

36,06 KDa, se corou fortemente, podendo ser a proteína denominada LipL36. Segundo Faine et al. (1999), existe uma correlação entre a LipL36 e a virulência da amostra, sendo esta PME expressa apenas sob condições "in vitro", quando a amostra se encontrada por muito tempo sendo cultivada em laboratório. Neste caso, a presença da LipL36 é totalmente coerente com as condições experimentais já que, em todo trabalho foi utilizada uma amostra padrão, sem ter sido feito nenhuma passagem em hospedeiro.

Biswas et al. (2005) nos testes de Western blot feitos com lisado de células completas identificaram as proteínas imunorreativas que tinham massas moleculares iguais a 67KDa, 65 KDa, 60 KDa, 45 KDa, 41 KDa e 32 KDa. Em praticamente todos os testes de Western blot realizados com extrato de células completas a proteína de massa molecular 32 KDa juntamente com a de 45 KDa foram imunodominantes. Neste trabalho, não foram encontradas proteínas comuns às proteínas descritas por aqueles autores. Um possível motivo para esta diferença de resultados está nas quantidades de proteínas necessárias para haver reação. Quando se trabalha apenas com membrana externa, é preciso trabalhar com grandes volumes de cultivo, o mesmo não acontece quando se utiliza lisado de célula inteira.

Uma PME de massa molecular igual a 51,1 KDa, denominada r1, tornou-se mais perceptível quando o teste foi realizado com maior quantidade de antígeno, 9µL por canaleta, linha de análise L3. Esta PME não foi visualizada pela eletroforese bidimensional realizada para determinação das PME de *L. hardjoprajitno*, assim como também não foi encontrada por outros autores (Cullen et al., 2002). Hsieh et al. (2005), entretanto, descrevem uma PME52, de massa molecular de 52,6 KDa em *L. interrogans*, que atua na interação entre as células do hospedeiro e as leptospiros durante a fase de infecção e que aumenta durante a fase estacionária de crescimento e é expressada em pacientes infectados por leptospiros. Apesar da proximidade entre as

massas moleculares das duas proteínas, resultados sobre a identidade da PME de 51,1 KDa encontrada nos géis da *L. hardjoprajitno*, não podem ser conclusivos. Verifica-se que a mesma é imunogênica posto que anticorpos foram detectados pelo teste de Western blot com soros de coelhos hiperimunizados. Não se pode descartar, entretanto, a hipótese que a mesma seja uma isoforma da PME52 descrita por Hsieh et al. (2005).

Nas linhas de análise L2 e L3 aparece uma proteína reativa de massa molecular igual a 21,08 KDa (r5). Embora ainda não totalmente caracterizada, ela aparece como o segundo maior constituinte das membranas externas de *L. interrogans* (Cullen et al., 2002), sendo detectada por anticorpos presentes em soros de camundongos convalescentes de leptospirose (Koizumi e Watanabe, 2003). Esta proteína de massa molecular estimada em 21,08 KDa apareceu tanto na eletroforese bidimensional como na unidimensional (teste de Western blot), podendo ser considerada como a Loa 22 (LipL22), sendo uma proteína conservada e imunomodulante entre as PMEs da *L. hardjoprajitno*.

4.4. Análise dos testes de Western blot realizados com soros de bovinos naturalmente infectados

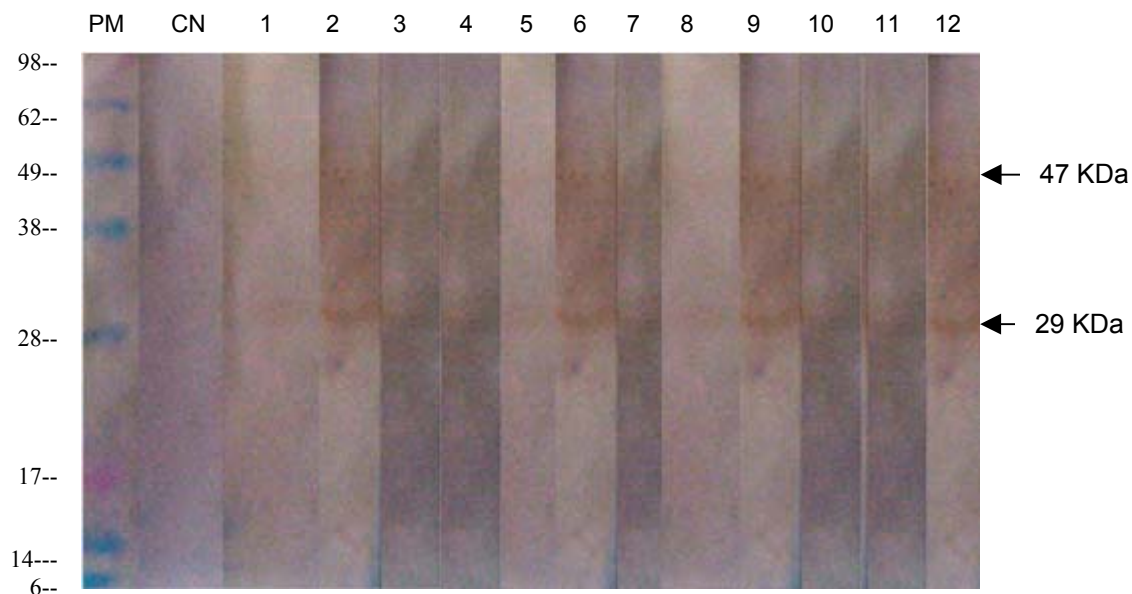
Foram analisados 13 soros de bovinos naturalmente infectados, sendo um negativo nos exames AMR e 12 positivos. Os soros positivos tinham títulos variando entre 1:100 e 1:1.600. No teste realizado com soro negativo, diluído dez vezes, nenhuma banda foi corada. Os 12 testes de Western blot com os soros positivos apresentaram o mesmo resultado posto que apenas duas bandas se coraram intensamente (Fig. 5). O programa Gel-Proanálise 3.1 (MediaCybernetics®) analisando as imagens dos soros positivos calculou os valores de massas moleculares iguais a 47 KDa e 29 KDa, respectivamente, para cada banda visualizada.

Comparando-se os resultados obtidos entre estes testes de Western blot com o gel bidimensional, localizamos as proteínas denominadas r2 e r3 (Tab.3) como sendo a

proteína com massa molecular aparente de 47 KDa (LipL48) e r6 e r7 (Tab.3), correspondendo à proteína reativa de 29 KDa (LipL32). No gel bidimensional, estas proteínas, r2, r3, r6 e r7, deixaram forte arraste. O fato das duas proteínas que reagiram nos testes de Western blot terem deixado arraste nos géis bidimensionais (Fig.3) vem demonstrar que essas proteínas não foram suficientemente desnaturadas na solução de amostra e que mantiveram suas estruturas terciárias conservadas promovendo assim a manutenção de epítomos determinados por essa conformação espacial. Ao contrário, as proteínas que se destacaram nos testes de Western blot realizados com soro hiperimune não deixaram nenhum tipo de arraste nos géis (Fig.3), demonstrando que os resultados nestes últimos testes foram determinados por epítomos independentes das estruturas terciárias dessas proteínas (estrutura linear) o que explicaria a diferença de resultados apresentadas entre os testes de Western blot realizados.

Os valores calculados para as massas moleculares dos polipeptídeos reagentes nestes testes estão muito próximos aos descritos para as proteínas imunodominantes, de 32KDa e 45 KDa, encontradas por Biswas et al. (2005), em soros de pacientes humanos naturalmente infectados. As pequenas diferenças de valores nas massas moleculares das proteínas reagentes podem ser explicadas tanto por possíveis clivagens da proteína LipL32, quanto por diferenças existentes entre os tampões de amostra do padrão de massa molecular e o tampão de amostra dos antígenos. Segundo Cullen et al. (2002) a proteína LipL32 possui massa molecular aparente igual a 29 KDa, quando sua porção N-terminal está removida.

Além disso, a forma de calcular as massas moleculares das proteínas reativas não foi a mesma utilizada por Biswas et al. (2005). A proximidade das massas moleculares entre a PME45 (Biswas et al., 2005) e a proteína de 47 KDa, detectada em amostras de soros de bovinos naturalmente infectados, sugere tratar-se da mesma PME, presente em diferentes amostras de *L. interrogans*.



Legendas: PM (padrão de massa molecular); CN (controle negativo); de 1 a 12 soros de bovinos positivos.

Figura 5. Testes de Western blot realizados com soros de animais naturalmente infectados.

5. CONCLUSÕES

O perfil protéico das proteínas de membrana externa da *L. hardjoprajitno* possui muitas similaridades com o perfil protéico da membrana externa de *L. interrogans* sem se mostrar idêntico ao mesmo.

A eletroforese bidimensional apresenta-se como o melhor método disponível para determinação do perfil protéico das proteínas de membrana externa da *L. hardjoprajitno*.

As massas moleculares aparentes das proteínas das membranas externas de leptospiros são dependentes do processo de extração.

O principal componente da membrana externa da *L. interrogans* sorovariedade

hardjoprajitno é uma proteína com massa molecular aparente de 22 KDa que participa ativamente na modulação da resposta imune em coelhos.

As proteínas de membrana LipL32 e PME45 induzem maior resposta humoral em bovinos naturalmente infectados.

A resposta humoral de bovinos naturalmente infectados está, aparentemente, subordinada à estrutura terciária das proteínas de membrana externa das leptospiros.

Os testes de Western blot realizados com soro hiperimune de coelho e com soros de animais naturalmente infectados mostram perfis protéicos diferentes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, V. E. M.; MOREIRA, E. C.; NAVEDA, L. A. B. et al. Frequência 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.430-435, 2005.
- 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.151-158, 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.1772-1777, 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.4448-4458, 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.2311-2318, 2002.
- CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes, **FEMS Microbiol. Let.**, v.28, p.291-318, 2004.
- 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.5789-5796, 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.
- 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.1131-1140, 1991.
- 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, 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.
- 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.1341-1347, 2005.
- HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, B. M.; MORAES, Z. M. et al. Leptospirose bovina em Uruará, PA, Município da Amozônia Oriental. **Arq. Inst. Biol.**, v.67, n.1, 2000.
- 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.151-154, 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.

JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G. Differentiation pathogenic and saprophytic *Leptospira*, **J. Bacteriol.**, U.S.A., v.94, n.1, p.27-31, 1967.

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.

LANGONI, H.; MEIRELIS, L. R.; GOTTSCHALK, S. et al. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do estado de São Paulo, **Arq. Inst. Biol.**, v.67, n.1, 2000.

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.

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.

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.

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.

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.173-187, 1997.