

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola



Dissertação

**Vacina Recombinante de Subunidade contra
Leptospirose:**
Avaliação do Potencial Imunogênico de Lipoproteínas

Daiane Drawanz Hartwig

Pelotas, 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DAIANE DRAWANZ HARTWIG

**VACINA RECOMBINANTE DE SUBUNIDADE CONTRA
LEPTOSPIROSE:**

Avaliação do Potencial Imunogênico de Lipoproteínas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Biologia Molecular).

Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Pelotas, 2006

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB-10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

H337v Hartwig, Daiane Drawanz
 Vacina recombinante de subunidade contra leptospirose :
 avaliação do potencial imunogênico de lipoproteínas / Daiane
 Drawanz Hartwig ; orientador Odir Antônio Dellagostin. –
 Pelotas, 2006. – 65f. : il. color.; tab. – Dissertação
 (Mestrado). Programa de Pós-Gradua-ção em Biotecnologia
 Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de
 Pelotas. Pelotas, 2006.

 1.Biotecnologia. 2.Leptospirose. 3.Vacina recombinante.
 4.Lipoproteínas. 5.*Leptospira*. I.Dellagostin, Odir Antônio.
 II.Título.

CDD: 615.372

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (Orientador), Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Antônio Guimarães Aleixo, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Pedro Almeida, Fundação Universidade de Rio Grande.

Dr. Fabrício Rochedo Conceição, Universidade Federal de Pelotas.

Dedicatória

Aos meus pais Rudi e Marli, pelo exemplo de caráter, força e amor dedicados à minha formação e pelo incentivo de uma vida inteira.

À minha irmã Andréia, por todos os momentos que passamos juntas.

Ao meu namorado Élcio por todo o amor, companheirismo e amizade, por acreditar em mim, sempre me apoiando e incentivando a seguir em frente.

Á Deus pela força espiritual.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar um Curso de Pós - Graduação de qualidade.

Ao meu orientador, Odir A. Dellagostin, pela orientação e experiência dispensada na realização deste trabalho, contribuindo na minha formação pessoal e profissional.

Aos meus pais e à minha irmã Andréia pelos laços de amor e respeito construídos durante toda a vida, por estarem do meu lado nos momentos de alegria e tristeza, vibrando com minhas vitórias e me consolando nas derrotas, sempre com palavras de apoio.

Ao meu namorado Élcio, pelo amor e companheirismo em todos os momentos que passamos juntos, por acreditar em mim e me apoiar em meus ideais.

Aos amigos e colegas do laboratório de Biologia Molecular, Alan, André, Andréia, Ângela, Cristina, Éverton, Fabiana, Fabrício, Francine, Gustavo, Luciano, Michel, Michele, Natália, Sandra, Sibebe, Suselaine, Reginaldo, Robson, Simone, Tessália e Vanuza, pela amizade, bom convívio e pelo apoio quer fosse por palavras ou gestos de incentivo.

Aos demais colegas, estagiários e amigos do Centro de Biotecnologia, pelos momentos de descontração e apoio durante todo o Mestrado.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Resumo

HARTWIG, Daiane Drawanz. Universidade Federal de Pelotas. **Vacina Recombinante de Subunidade contra Leptospirose: Avaliação do Potencial Imunogênico de Lipoproteínas**. 2006. 65f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose é considerada um problema global de saúde na área humana e veterinária. É uma zoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira*, prevalente em todos os continentes. O desenvolvimento de uma vacina potente e eficaz contra a leptospirose se justifica, já que as convencionais induzem imunidade pouco duradoura e sorovar específica. A busca por uma vacina multivalente, através da identificação de imunógenos protéicos conservados, que gerem proteção cruzada, é o foco no estudo da leptospirose e, neste sentido, lipoproteínas de *Leptospira* são apontadas como potenciais candidatos. No presente estudo, utilizou-se a análise *in silico*, como estratégia na identificação de lipoproteínas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni com potencial imunogênico, visando o desenvolvimento da vacina recombinante. Foram selecionados oito genes (*LIC11058*, *LIC10054*, *LIC20172*, *LIC13059*, *LIC11567*, *LIC10091*, *LIC10009* e *LIC13305*) que codificam lipoproteínas associadas à membrana de *L. interrogans*. Os genes foram clonados no vetor de expressão em *E. coli*, pQE30, que permite a fusão das proteínas recombinantes com uma cauda de histidinas. As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade, inoculadas em camundongos e a resposta imune humoral avaliada através de ELISA. Sete das oito lipoproteínas avaliadas foram capazes de induzir resposta imune humoral em camundongos, no entanto, os níveis de resposta variaram entre elas. As proteínas purificadas foram também testadas quanto à reatividade com soro de pacientes com diagnóstico de leptospirose. Seis proteínas foram reconhecidas por soro humano, confirmando a presença de anticorpos específicos contra estas proteínas. As lipoproteínas *LIC11058*, *LIC13059*, *LIC11567* e *LIC10091* foram as que se destacaram pela alta imunogenicidade e reatividade com soro de pacientes com leptospirose. Estas proteínas apresentam potencial para serem utilizadas como antígenos vacinais e serão selecionadas para estudos de imunoproteção.

Palavras-chaves: *Leptospira*, Leptospirose, Vacina, Lipoproteínas.

Abstract

HARTWIG, Daiane Drawanz. Federal University of Pelotas. **Subunit Recombinant Vaccine against Leptospirosis: Evaluation of the Immunogenic Potential of Lipoproteins.** 2006. 65p. Dissertation (Master Degree) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is a global concern for human and veterinary health. It is a zoonosis caused by bacteria belonging to the *Leptospira* genus, prevalent worldwide. The development of a potent and effective vaccine against leptospirosis is justified, once conventional induce only short lived and serovar-specific immunity. The search for multivalent vaccine, through the identification of conserved, antigenic and cross-protective proteins, is the focus in leptospirosis research and, for this reason, lipoproteins of *Leptospira* are potential candidates. In the present study, *in silico* analysis was used as a strategy for identification of potentially protective lipoproteins of *L. interrogans* serovar Copenhageni, aiming at developing recombinant vaccines. Eight genes were selected (*LIC11058*, *LIC10054*, *LIC20172*, *LIC13059*, *LIC11567*, *LIC10091*, *LIC10009* and *LIC13305*), which code for lipoproteins associated to the membrane of *L. interrogans*. These genes were cloned in expression vector in *E. coli*, pQE30, that allows the fusion of the recombinant proteins to a histidine tag. The proteins were purified for affinity cromathography, inoculated in mice and the humoral immune response evaluated by ELISA. Seven of lipoproteins evaluated were able to induce humoral immune response in mice, however, the levels of immune response varied among them. The purified proteins were also evaluated regarding their reactivity against human sera, positive for leptospirosis. Six of the proteins were recognized by human sera, confirming the presence of antibodies against these proteins. The lipoproteins *LIC11058*, *LIC13059*, *LIC11567* and *LIC10091* were highly immunogenic for mice and antigenic when reacted against human sera. These proteins are potential vaccine antigen candidates and they will be selected for immunoprotection studies.

Keywords: *Leptospira*, Leptospirosis, Vaccine, Lipoproteins.

Lista de Figuras

Figura 1	Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1%	41
Figura 2	Mapas dos plasmídeos construídos.....	42
Figura 3	SDS-PAGE 15% corado com <i>Comassie Blue</i> , mostrando a cepa de <i>E. coli</i> TOP10F expressando as proteínas recombinantes	43
Figura 4	<i>Western blotting</i> com anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:3000	44
Figura 5	Gel de poliacrilamida 15% corado com <i>Comassie Blue</i> mostrando as oito proteínas recombinantes purificadas utilizando o sistema ÄKTAPrime (Ni ⁺² -Sepharose)	45
Figura 6	Resposta imune humoral apresentada pelos animais inoculados com as proteínas recombinantes e do grupo controle negativo salina/Al(OH) ₃	47
Figura 7	Reconhecimento das proteínas recombinantes pelo soro imune de camundongos inoculados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 (bacterina)	48
Figura 8	Antigenicidade das proteínas recombinantes de <i>L. interrogans</i>	50

Lista de Tabelas

- Tabela 1** Seqüência dos *primers* utilizados nas ampliações por PCR, enzimas de restrição utilizadas na clonagem e número de acesso das proteínas no GenBank33
- Tabela 2** Esquema de vacinação dos animais utilizados para avaliação da resposta imune das vacinas de subunidade.....37
- Tabela 3** Tamanho dos genes inteiros e recombinantes e massa molecular das proteínas nativas e recombinantes41
- Tabela 4** Rendimento e concentração das proteínas recombinantes quantificadas pelo método de Bradford.....45

Lista de Símbolos e Abreviações

μg – micrograma

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

μL – microlitro

μm – micrômetro

adj. – adjuvante

Al(OH)₃ – hidróxido de alumínio

AN – número de acesso das proteínas no GenBank

BSA – albumina sérica bovina

CIP – enzima fosfatase alcalina

cm – centímetro

CPqMG – Centro de Pesquisas Gonçalo Monis

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – 2' - desoxinucleotídeo 5' – trifosfatos

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EMJH – Meio Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g – força da gravidade

IM – intramuscular

IP – intraperitonal

IPTG – isopropil β -D-tiogalactosídeo

kDa – kilodalton

kHz – kilohertz

kV – kilovolts

L – litros

LB – Meio Luria - Bertani

LIC – *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

M – molar

MAT – teste de aglutinação microscópica

MgCl₂ – cloreto de magnésio

min – minutos

mL – mililitro

mm - milímetros

mM – milimolar

NaCl – cloreto de sódio

NaH₂PO₄ – dihidrogenofosfato de sódio

ng – nanograma

Ni⁺² – níquel

nm – nanômetro

OD – densidade óptica

OM – membrana externa

OMPs – proteínas da membrana externa

ORFs – fase aberta de leitura

PBS – tampão fosfato salino

PBS -T – tampão fosfato salino acrescido de 0,05% de Tween 20

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – potencial de hidrogênio

rDNA – ácido desoxirribonucléico ribossomal

rpm – rotações por minuto

S – segundos

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

uFD – microfarad

x – vezes

Sumário

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Leptospirose	14
1.2	Agente etiológico	15
1.3	Epidemiologia	17
1.4	Tratamento e prevenção da leptospirose	19
1.5	Vacinas contra a leptospirose	20
1.5.1	Vacinas recombinantes	22
1.5.1.1	Vacinas de subunidade	23
1.6	Lipoproteínas de <i>L. interrogans</i> como potenciais vacinógenos	26
1.7	Vacinologia reversa	29
2	OBJETIVO GERAL	30
2.1	Objetivos específicos	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Cepas, cultivo e extração de DNA	31
3.2	Preparo de células competentes e transformação bacteriana	31
3.3	Identificação das proteínas candidatas a vacina: análise <i>in silico</i>	32
3.4	Desenho dos <i>primers</i> e amplificação dos genes	32
3.5	Clonagem, expressão das proteínas recombinantes	33
3.6	Purificação das proteínas recombinantes	35
3.7	Diálise lenta das proteínas recombinantes	36
3.8	Quantificação das proteínas recombinantes	36
3.9	Seqüenciamento dos vetores construídos	36
3.10	Imunização dos camundongos	37
3.11	Avaliação da resposta imune humoral	38
3.12	Reatividade do soro imune contra <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130 com as proteínas recombinantes	38
3.13	Análise estatística	39
3.14	Reconhecimento das proteínas pelo soro de pacientes com leptospirose	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Identificação <i>in silico</i> das proteínas candidatas a vacina de subunidade	40
4.2	Amplificação dos genes	40
4.3	Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes	41

4.4	Resposta imune humoral induzida pelas vacinas de subunidade	46
4.5	Reatividade do soro imune contra <i>L. interrogans</i> com as proteínas recombinantes.....	47
4.6	Análise estatística	48
4.7	Reconhecimento das proteínas pelo soro de pacientes com leptospirose	49
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÕES	56
7	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leptospirose

A leptospirose é classificada como uma antropozoonose direta que ocorre de forma endêmica mundialmente. Ela é causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* e tem sido considerada nos últimos 10 anos como uma doença emergente que afeta humanos e diversas espécies de animais domésticos e silvestres (McBRIDE et al., 2005).

O ressurgimento do interesse no controle da leptospirose deve-se a sua ocorrência como epidemia, tanto em países de clima tropical, subtropical ou temperado, desenvolvidos ou em desenvolvimento (BHARADWAJ, 2004). O Brasil e a China são os países em que a leptospirose é tida como um dos maiores problemas de saúde pública (McBRIDE et al., 2005).

O aumento na incidência de casos costuma ocorrer durante os períodos de chuva e enchentes, resultando em perdas de importância econômica e social. Na América do Sul e Central esses períodos têm sido intensificados pelo fenômeno climatológico “El Niño” (KO et al., 1999; PLANK; DEAN, 2000; LEVETT, 2001), que é caracterizado por um significativo aumento nos níveis pluviométricos.

A contaminação humana por *Leptospira* spp. resulta do contato com a urina contaminada de animais portadores, que pode ser direto ou indireto, através de água, solo ou alimentos contaminados (LEVETT 2001; BHARTI et al., 2003; BHARADWAJ, 2004). A espiroqueta penetra pelas superfícies mucosas, pele lesada ou até mesmo íntegra, se exposta por longo período ao meio contaminado, dando início a fase aguda ou septicêmica, que dura cerca de uma semana. Após, invade a circulação, multiplicando-se e migrando aos órgãos de eleição, quando então desaparece da circulação dando início a fase imune. É nesta fase que há produção de anticorpos e eliminação das leptospiros pela urina (MITCHISON et al., 1997; LEVETT, 2001; BAL, 2005). Desta forma a leptospirose se manifesta como uma enfermidade bifásica.

As manifestações clínicas da doença em 90% dos casos são benignas e autolimitadas (LEVETT, 2001), não permitindo uma distinção segura entre a leptospirose e inúmeras outras síndromes febris e miálgicas semelhantes. Os sintomas vão desde um estado febril moderado, com vômitos, dores de cabeça, musculares e abdominais, evoluindo em 5 a 15% dos casos a quadros mais severos

de doença de *Weil*, caracterizada por falhas renais e do fígado ou leptospirose pulmonar, que acarreta hemorragia pulmonar fatal, com uma taxa de mortalidade de 5 a 40% (SEHGAL; MURHEKAR; SUGUNAN, 1995; FAINE, 1999; BHARTI et al., 2003). A maioria das complicações clínicas da leptospirose está associada, portanto, à localização das espiroquetas nos tecidos durante a fase imune.

A leptospirose tem causado ainda impacto econômico para a agropecuária, com alta mortalidade nos rebanhos, abortos, natimortos, infertilidade e redução na produção de leite (BHARTI et al., 2003). Esses problemas resultam em graves prejuízos para os produtores e, conseqüentemente, para a economia dos países acometidos, pois causam transtornos produtivos e reprodutivos animais (FAINE, 1999).

1.2 Agente etiológico

A ordem Spirochaetales se subdivide em duas famílias. A família *Leptospiraceae* que compreende os gêneros *Leptonema*, *Turneria* e *Leptospira* e a família *Spirochaetacea* que inclui os gêneros *Borrelia* e *Treponema* (FAINE, 1999). Filogeneticamente, análises baseadas no seqüenciamento do 16S rDNA classificam *Leptonema* como um grupo a parte e dividem o gênero *Leptospira* em dois grupos: um formado por espécies patogênicas (*L. interrogans* senso Lato) e outro por não patogênicas (*L. biflexa* senso Lato) (FAINE, 1999). Em nível laboratorial as espécies saprófitas são diferenciadas das patogênicas por crescerem a 13° C, na presença de 225 µg.mL⁻¹ de 8-azaguanina e por sua incapacidade de formar células esféricas em 1 M de NaCl (LEVETT, 2001).

O gênero *Leptospira* é bastante diverso, contendo vários sorovares. Estes são antigenicamente distintos e mudanças na composição do LPS (lipopolissacarídeo) são responsáveis por esta diversidade antigênica (ZUERNER et al., 2000). Tradicionalmente, *Leptospira* spp. é subdividida em mais de 250 sorovares, que são classificados por absorção cruzada com antígenos heterólogos. Estes são agrupados em sorogrupos de acordo com seus determinantes antigênicos, através do teste de microaglutinação (MAT) (FAINE, 1999). Mais recentemente, a análise molecular, que se baseia em características genéticas, tem sido aplicada na classificação de *L. interrogans* senso Lato (FAINE, 1999) e tem conduzido a várias espécies dentro deste gênero: *L. interrogans* stricto sensu, *santorosai*, *weillii*, *inadai*, *wolbachii*, *borgpetersenii*, *kirschnerii*, *meyeri* e *noguchii* (RAMADAS et al., 1992).

Embora a reclassificação das leptospiros utilizando determinantes genéticos forneça informações taxonômicas relevantes, ela se desenvolve independentemente à classificação sorológica, que é mais aceita entre microbiologistas e epidemiologistas (BHARTI et al., 2003). As leptospiros são bactérias aeróbias estritas que crescem a temperatura de 28 a 30° C em meios simples. O crescimento é lento e as culturas podem levar semanas para positivar-se. As espécies patogênicas, ao contrário das saprófitas, não se multiplicam em condições naturais fora de um hospedeiro, mas sobrevivem em solo úmido, com pH ligeiramente alcalino e com baixa salinidade. Os sorovares patogênicos são mais sensíveis à radiação ultravioleta em relação aos saprófitas e, quando não expostos a esta, sua sobrevivência pode se estender até seis meses (VINETZ, 2001).

As espiroquetas que compõem *Leptospira* spp. são microrganismos móveis, filamentosos e espiralados, que somente podem ser visualizados em microscopia de campo escuro e de contraste de fase (FAINE, 1999). Seu tamanho é de 0,1 a 0,2 µm de diâmetro e de 6 a 20 µm de comprimento, com uma ou as duas extremidades curvadas como um ponto de interrogação (daí a denominação *interrogans*). Sua mobilidade deve-se a filamentos axiais dispostos um em cada pólo da célula, apresentando estrutura protéica complexa (FAINE, 1999). A OM (*outer membrane* - membrana externa) das leptospiros compartilha características tanto com bactérias Gram-positivas como com as Gram-negativas (ZUERNER et al., 2000), sendo que a porção lipopolissacarídica da célula tem composição similar a outras bactérias Gram-negativas (VINH; ADLER; FAINE, 1986). As leptospiros e as bactérias gram-negativas têm uma OM que funciona como uma barreira permeável, protegendo-as de condições de *stress*, tanto no meio externo quanto nos tecidos do hospedeiro (SHANG; SUMMERS; HAAKE, 1996).

Morfologicamente todas as leptospiros são indistinguíveis. A morfologia particular dos isolados varia com os cultivos *in vitro*, mas pode ser recuperada com passagens em hamsters (ELLIS et al., 1983).

O seqüenciamento do genoma revelou que seu material genético está dividido em dois cromossomos circulares: um maior com 4.279 kb (cromossomo I) e outro menor com 350 kb (cromossomo II) (REN et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2004a). Estes dados foram revelados com o seqüenciamento do genoma do isolado *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni L1-130 (FIOCRUZ, BA) (NASCIMENTO et al., 2004b), obtido de um paciente com leptospirose severa

durante um surto epidêmico em 1996 (KO et al., 1999; BAROCCHI et al., 2001). Este sorovar é considerado o mais patogênico para o homem e está frequentemente relacionado a casos severos de leptospirose humana (LEVETT, 2001).

1.3 Epidemiologia

A leptospirose é considerada um paradigma dentre as doenças infecciosas. A globalização e as desigualdades sociais produzem padrões epidemiológicos divergentes para pobres e ricos (McBRIDE et al., 2005). O ciclo de transmissão da leptospirose envolve a interação entre reservatórios animais, um ambiente favorável e grupos humanos susceptíveis. Os fatores de risco associados à infecção dependem, portanto, de características da organização espacial dos ecossistemas e das condições de vida e trabalho da população (MURHEKAR et al., 1998).

Em países desenvolvidos a leptospirose está comumente associada à prática de atividades recreacionais, viagens e esportes aquáticos, como, por exemplo, natação, canoagem, *rafting* e pesca em água doce (PLANK; DEAN, 2000). No entanto, a incidência é maior nos países quentes e/ou em desenvolvimento, por causa da maior sobrevivência da leptospira e do contacto mais freqüente com animais e ambiente contaminado. A doença é sazonal (verão e outono) nos países temperados, e acompanha a precipitação pluviométrica nos países tropicais (LEVETT, 2001). O diagnóstico ineficiente da infecção associado à doença autolimitante faz com que o número real de casos seja, freqüentemente, subestimado.

Um milhão de pessoas reside em regiões sem as mínimas condições básicas de saneamento. No Brasil e nas grandes cidades do terceiro mundo a leptospirose associa-se às comunidades urbanas pobres (favelas) devido á pobreza, degradação da vida urbana, proliferação de ratos, acúmulo de lixo, crescente superpopulação e períodos de cheias e enchentes. Somente no Brasil mais de 10.000 casos de leptospirose são reportados anualmente devido a ciclos de chuva (McBRIDE et al., 2005).

A infecção humana se dá principalmente pelo contato direto ou indireto com a urina de animais infectados (LEVETT, 2001). A urina destes animais é a principal fonte de disseminação, já que as leptospiros concentram-se nos túbulos contorcidos proximais dos rins (ZUERNER et al., 2000; BHARTI et al., 2003). Concentrações significantes de bactérias ($> 10^6$ células.mL⁻¹) tem sido detectadas na urina de

animais infectados (ZUERNER et al., 2000). Um animal infectado pode permanecer assintomático e continuar a eliminar leptospiros em sua urina ao longo de toda a vida (PLANK; DEAN, 2000).

Neste sentido, os ratos e outros roedores são considerados os principais reservatórios e agentes disseminadores da infecção, no entanto, animais silvestres e domésticos, como cães e gatos, também são potencialmente capazes de transmitir a doença (BHARTI et al., 2003; BHARADWAJ, 2004). Muitos cães mesmo imunizados podem eliminar leptospiros vivos em sua urina por longos períodos (PLANK; DEAN, 2000; BHARADWAJ, 2004). Dentre os roedores domésticos (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*) dá-se maior importância ao *R. norvegicus* (rato de esgoto) e *R. rattus*, comuns em zonas urbanas e que são portadores de *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae, considerado o sorogrupo mais patogênico ao homem. Já cães e gatos são reservatórios de *L. canicola* e *L. hardjo*, dominantes no meio rural (BARCELLOS et al., 2003). No entanto, contaminações por Icterohaemorrhagiae no meio rural também ocorrem. Portanto, a prevalência de diferentes sorovares de *Leptospira* causando doença dentro de uma população depende dos reservatórios animais e do sorovar presente, bem como de fatores do meio ambiente, ocupação, práticas agrônomicas e agrícolas (BHARTI et al., 2003).

Em áreas urbanas o contato humano e animal com águas e lama contaminados, que ocorre mais frequentemente durante períodos de chuva intensa e enchentes, demonstram a importância hídrica na transmissão da leptospirose (VASCONSELLOS et al., 1994). As leptospiros dependem da água para sobreviver e alcançar o hospedeiro. Existem outras formas de contaminação que são consideradas menos importantes, como a manipulação de tecidos animais e ingestão de água e alimentos contaminados. Nas zonas urbanas a leptospirose humana apresenta alguns grupos de risco, como: profissionais que lidam com animais, médicos veterinários, trabalhadores de abatedouros, inspetores de carnes, mineradores, trabalhadores que têm contato com esgoto, entre outros (RATNAM et al., 1993; BALAKRISHNAN; RAJENDRAN; SURESH BABU, 1994). Todos os ambientes relacionados à ocupação e ou manipulação animal constituem risco de contaminação tanto na zona urbana como na zona rural (LEVETT, 2001).

Nas zonas rurais trabalhadores expostos a locais contaminados com urina de ratos e demais reservatórios, estão entre o grupo mais acometido pela doença. O Estado do Rio Grande do Sul possui representativo número de trabalhadores rurais

e apresenta uma alta incidência de leptospirose, com cerca de 10 casos por 100.000 habitantes, superior à média do país (3,5 casos por 100.000 habitantes). O local provável de infecção, indicado pela investigação epidemiológica de casos, aponta tanto para o ambiente de trabalho quanto para o domicílio como principais formas de contato com o agente (BARCELLOS et al., 2003). Neste estado onde a incidência é maior, há uma diversidade de situações de exposição, reservatórios, agentes etiológicos e quadros clínicos. As maiores taxas de incidência foram observadas em áreas de atividade agrícola, principalmente áreas de lavoura irrigada, onde existem características ecológicas favoráveis à transmissão da leptospirose, como a proliferação de roedores associada à produção agrícola intensiva (BARCELLOS et al., 2003).

1.4 Tratamento e prevenção da leptospirose

A leptospirose é um importante problema de saúde pública em países do terceiro mundo, onde o controle depende principalmente de medidas higiênico-sanitárias básicas e eficientes. No entanto, até o presente momento poucas medidas efetivas para prevenção da leptospirose têm sido implantadas (McBRIDE et al., 2005).

Em locais onde a contaminação humana costuma ocorrer por contato direto com a urina de animais portadores, ou através de solo ou água contaminados, medidas como: limpeza e a desratização de residências, quintais e locais de trabalho, eliminação dos fatores de risco que promovam quedas e arranhaduras durante atividades profissionais, a drenagem das coleções de água, a desumidificação e ventilação adequada dos locais fechados, são medidas cuja eficácia já foi bem demonstrada. A desinfecção com produtos clorados é raramente aplicável. O manuseio profissional de material de origem animal (limpeza de gaiolas, manuseio de carcaças) implica no uso de avental, óculos e luvas (HOUPIKIAN et al., 2002).

Medidas profiláticas são imprescindíveis no controle da leptospirose e, neste sentido, a quimioprofilaxia é empregada na pré-exposição à ambientes de risco e se faz pelo emprego oral de doxiciclina em doses semanais de 200 mg ministradas enquanto durar o risco. A eficácia em reduzir a incidência alcança 95%. É um meio de proteger indivíduos expostos durante um breve intervalo de tempo. A profilaxia

pós-exposição (na verdade o tratamento de uma possível infecção recente) se faz pelo emprego de doxiciclina, 100 mg a cada 12 horas durante cinco as sete dias (LOMAR; DIAMENT; TORRES, 2000).

Quando há contaminação e desenvolvimento da infecção o tratamento contra a leptospirose se dá pela administração de antibióticos e, em seres humanos, está restrito a penicilina, ampicilina, amoxicilina, oxitetraciclina e doxiciclina. Embora existam relatos da eficácia de outros antibióticos (p. ex., ceftriaxona, eritromicina) em infecções experimentais, estes antibióticos não podem ser indicados por falta de dados clínicos. O efeito dos antibióticos é mais evidente na supressão da leptospirúria e a antibioticoterapia com penicilina e doxiciclina, reduz a duração e a gravidade dos sintomas, mas a sua influência na mortalidade é controversa (LEVETT, 2001).

Frente a todas estas restrições, medidas mais efetivas de controle e prevenção vem sendo desenvolvidas e, atualmente, esforços estão sendo concentrados no desenvolvimento de uma vacina mais potente e eficaz contra a leptospirose.

1.5 Vacinas contra a leptospirose

Vacinas estão entre as intervenções médicas mais importantes contra a maioria das infecções. Vacinas para prevenção da leptospirose humana estão sendo avaliadas em alguns países, como: Cuba (MARTINEZ et al., 2000; MARTINEZ et al., 2004), Rússia (IKOEV et al., 1999) e China (ZHUO; WANG; LAN, 1995). Em Cuba foram vacinadas mais de 10.000 pessoas com uma bacterina, obtendo-se 78% de proteção entre as mesmas, não sendo observado nenhum efeito colateral (MARTINEZ et al., 2004). Já para o protótipo de vacina testado em humanos na China, crianças menores de 14 anos não apresentaram proteção (ZHUO; WANG; LAN, 1995).

Na área veterinária as vacinas disponíveis comercialmente para o controle da leptospirose são baseadas na célula inteira inativada ou em preparados da membrana de leptospiros patogênicas. Estes tipos de vacinas conferem resposta protetora através da indução de anticorpos contra o LPS destas bactérias (PENA-MOCTEZUMA et al., 1999), podendo prevenir o desenvolvimento da doença, mas não a leptospirúria (ALT; ZUERNER; BOLIN, 2001).

A resposta imunológica contra a leptospirose é tanto celular quanto humoral. Após a entrada da espiroqueta no hospedeiro as células T e células B dependentes são estimuladas. A eliminação inicial é feita por fagócitos, sendo a maioria das leptospirosas é digerida nos vacúolos de macrófagos e neutrófilos. A atividade fagocítica das células polimorfonucleadas é iniciada por anticorpos opsonizantes (SAMBASIVA et al., 2003). Embora a resposta imune celular seja considerada importante, a supressão das células que a medeiam costuma ocorrer durante a infecção, com redução no número de linfócitos CD_4^+ , bem como, de sua capacidade de resposta a antígenos (LEVETT, 2001). A resposta de anticorpos contra a leptospirose é clássica, onde aparece primeiro um pico no nível de IgM, sendo este rapidamente seguido por aumento nos níveis de IgG, que persistem por mais tempo (SAMBASIVA et al., 2003). Contudo, convém ressaltar, que os mecanismos de proteção contra a leptospirose ainda não são totalmente compreendidos.

Nas imunizações a resposta gerada é predominantemente humoral e sorovar específica (FAINE, 1999). Assim, protegem somente contra infecções causadas por sorovares homólogos ou antigenicamente relacionados. No soro humano de pacientes com leptospirose têm sido encontrados anticorpos contra diversos antígenos protéicos presentes na OM, espaço periplasmático e também contra o LPS (PLANK; DEAN, 2000; BHARTI et al., 2003).

As vacinas convencionais contra leptospirose, tanto para uso humano quanto veterinário, possuem sucesso limitado, pois falham ao induzir proteção contra a infecção. As vacinas baseadas na célula inteira inativada (bacterinas) estimulam imunidade restrita (6 a 12 meses), necessitando repetir a vacinação para manutenção da imunidade. Nestes casos, a resposta imune desencadeada é contra o LPS e, portanto, restrita a sorovares antigenicamente relacionados (PETERSEN et al., 2001; BHARTI et al., 2003). Existe um grande número de sorovares patogênicos (>250), o que impõe uma maior limitação para a produção de uma vacina com componentes multi-sorovar (GAMBERINI et al., 2005).

Atualmente é imprescindível o desenvolvimento de uma vacina multivalente protetora e de amplo espectro contra a leptospirose, através da identificação de antígenos protéicos conservados. Neste sentido, proteínas de membrana externa de *Leptospira* têm sido os maiores alvos para o desenvolvimento da vacina. No entanto, uma vacina licenciada para humanos ainda levará muito tempo (FAINE, 1999).

1.5.1 Vacinas recombinantes

As práticas convencionais de desenvolvimento de vacinas têm sido, com o passar dos anos, substituídas por uma nova metodologia que otimiza as pesquisas e a produção de vacinas, tendo como base a identificação de alvos potenciais, formas mais eficazes de administração dos antígenos e apresentação destes as células do sistema imune.

As vacinas convencionais, baseadas na célula inteira inativada do patógeno, podem apresentar alguns riscos na administração, como o desenvolvimento da doença, que costuma ocorrer em alguns casos (KOIZUMI; WATANABE, 2005). A duração da imunidade obtida com estas vacinas é curta, requerendo novas imunizações, sendo a resposta imune desencadeada, principalmente, contra frações celulares do patógeno, como por exemplo, proteínas de membrana externa e não contra a célula inteira. A imunidade conferida por estas vacinas é sorovar específica, não atribuindo, portanto, proteção cruzada (McBRIDE et al., 2005).

Neste sentido, a engenharia genética vem despontando como alternativa para o melhoramento das vacinas já existentes e no desenvolvimento de novas vacinas, as chamadas vacinas recombinantes. Estas vacinas podem ser desenvolvidas de diversas maneiras, dependendo do antígeno em questão e do tipo de resposta imune que se busca desencadear contra ele. Dentre os tipos de vacinas recombinantes existentes podemos citar: vacinas de DNA, vacinas vetorizadas e vacinas de subunidade (KREUZER; MASSEY, 2002). As vacinas de subunidade foram objeto de avaliação do presente estudo.

As vacinas de DNA baseiam-se na inserção de genes inteiros ou de fragmentos destes, que codificam para uma ou mais proteínas do patógeno, em uma molécula de DNA auto-replicativa, sem risco infeccioso, chamada plasmídeo. Após a clonagem gênica, estes vetores são então introduzidos em uma célula hospedeira, comumente *Escherichia coli*, para que se possa obter várias cópias do gene inserido no plasmídeo (SILVA, 1997). A administração deste tipo de vacina pode ser feito tanto por via intramuscular, intranasal (aerossóis) e intradérmica, esta última através do bombardeamento com partículas de ouro cobertas com o material genético (BABIUK et al., 2000). As vacinas de DNA induzem tanto resposta imune celular (células T citotóxicas e T auxiliares) quanto humoral (WHITTON et al., 1999; HOWARTH; ELLIOTT, 2001). Estas vacinas têm como vantagem a estabilidade e o custo relativamente baixo de produção, pois podem ser carregados no mesmo

plasmídeo vários genes, que codificam proteínas diferentes e ainda a vantagem de não oferecerem risco infeccioso (ADA; RAMSHAW, 2003). No entanto, estas vacinas apresentam também desvantagens como possibilidade de recombinação do DNA e a indução da tolerância em neonatos (ADA; RAMSHAW, 2003), além de não possuírem liberação para uso humano e veterinário por parte dos órgãos competentes.

Nas vacinas vetorizadas, bactérias ou vírus são os carreadores de genes de patógenos, que serão expressos dentro do organismo a ser imunizado. Por exemplo, o vírus da vaccinia e adenovírus tem sido utilizados para a expressão de antígenos heterólogos (MACKETT; SMITH; MOSS, 1982). Vaccinia e Adenovírus recombinantes foram utilizados para expressar a glicoproteína G do vírus rábico (BROCHIER et al., 1991; PAOLAZZI; PEREZ; FILIPPO, 1999). A vacina contra a raiva vetorizada por vaccinia, já é utilizada em vários países. Uma variedade de outros antígenos virais já foram expressos em vaccinia, como as proteínas Gag, Pol, Tat, Rev, Nef e Env de SIV, onde a combinação dos diferentes sistemas de apresentação de antígenos se mostrou eficaz (MICHELINI et al., 2004). Antígenos bacterianos como o antígeno 85A de *Mycobacterium tuberculosis* também já foram expressos em vaccinia (McSHANE et al., 2004)

As vacinas baseadas em vetores têm suas limitações, pois tem como base microrganismos vivos. Os vírus, por exemplo, utilizados como vetores neste tipo de vacina apresentam problemas quanto à proliferação, pois o crescimento de grandes quantidades destes organismos fora do corpo humano não é fácil (KREUZER; MASSEY, 2002). Bactérias também podem ser usadas como vetores vacinais. Nesse caso, o material genético inserido provoca a exibição de antígenos de outros microrganismos na superfície bacteriana, induzindo resposta imune. No entanto, são necessários vários ensaios com estes organismos para garantir a segurança na sua administração em humanos e animais, pois o principal problema das vacinas vetorizadas é a imunidade contra o vetor (vírus ou bactéria).

1.5.1.1 Vacinas de subunidade

As vacinas de subunidade são baseadas em frações do microrganismo e estão entre as mais produzidas e administradas para prevenção de uma ampla gama de enfermidades. Atualmente, o exemplo clássico de vacina de subunidade é a vacina contra a hepatite B, que vem sendo utilizada há vários anos.

A substituição das purificações convencionais, mais trabalhosas e complexas, pela produção de proteínas recombinantes heterólogas, que apresentam maior rentabilidade com um custo mais baixo, tem sido cada vez mais comum (HOCKNEY, 1994).

As proteínas recombinantes heterólogas são produzidas tanto em organismos procariotos como em eucariotos e, uma vez expressas, podem ser rapidamente purificadas e administradas aos animais em altas concentrações. Isto, somado á novas estratégias de apresentação de antígenos e a uma nova geração de adjuvantes, aumentará significativamente o potencial destas subunidades de antígenos de induzirem uma imunidade celular e humoral (CLARK; CASSIDY-HANLEY, 2005).

A bactéria *E. coli* é um importante microrganismo utilizado na expressão de proteínas recombinantes (MAKRIDES, 1996). Uma ampla variedade de antígenos vacinais já foi expressa neste microrganismo (ALAM; VANCE; LEHNER, 2002; KUMAGAI et al., 2002; MAO et al., 2003; MASI; PAGES; PRADEL, 2003; DING et al., 2005; HAUK et al., 2005; JIANG et al., 2006; LACK et al., 2006).

No entanto, em alguns casos a estimulação do sistema imune por estes antígenos pode ser variáveis, pois uma série de fatores podem intervir, tais como: características peculiares do antígeno, formas de apresentação destes ao sistema imune e via de imunização utilizada. Sistemas de expressão de proteínas baseados em *E. coli* ou em leveduras, podem gerar um *foldig* incorreto da proteína, acarretando ausência de epítomos conformacionais requeridos na produção de anticorpos neutralizantes e protetores no hospedeiro (SWARTZ, 2001; GRIFFITH et al., 2003). Similarmente, a formação de agregados protéicos (corpúsculos de inclusão), comumente formados devido a níveis muito elevados de expressão, comprometem a estrutura tri-dimensional nativa das proteínas (SWARTZ, 2001). Em contraste, níveis baixos de expressão podem estar relacionados com a degradação das proteínas por proteases do hospedeiro, *codon usage*, toxicidade da proteína recombinante para a célula hospedeira e, além disso, a incapacidade destes sistemas de expressão efetuarem modificações pós-traducionais e a dificuldade de expressarem estas proteínas para o sobrenadante de cultivo (WEICKERT et al., 1996; GEORGIU; SEGATORI, 2005).

Uma série de vacinas de subunidade baseadas no método recombinante vem sendo testadas na imunização contra vários patógenos, tanto na área médica quanto

veterinária. A proteína MPB83 de *Mycobacterium bovis* foi clonada e expressa em *E. coli*, para desenvolvimento e avaliação de uma vacina de subunidade contra a tuberculose bovina (JIANG et al., 2006). A imunização via oral de suínos com a proteína recombinante FaeG, obtida de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), foi capaz de induzir imunidade sistêmica e de mucosas específica contra a proteína heteróloga (VERDONCK et al., 2004).

Altos níveis de expressão da proteína HpaA foram identificados em diferentes isolados clínicos de *Helicobacter pylori* e anticorpos específicos, produzidos por pacientes infectados, indicam que HpaA é um ótimo antígeno para o desenvolvimento da vacina. Estudos com a proteína recombinante demonstraram imunoreatividade e antigenicidade satisfatória, através de ensaios em coelhos, os quais produziram anticorpos específicos contra a proteína recombinante (MAO et al., 2003).

A toxina hemolítica Asp de *Aspergillus fumigatus* é uma proteína com alta afinidade por lipoproteínas de baixa densidade (Ox-LDL). A proteína recombinante submetida a ensaios de *Western blotting* demonstrou imunoreatividade específica com anticorpos anti-Asp (KUMAGAI et al., 2002). A imunização intranasal de camundongos com a proteína Sfb1 de *Streptococcus pyogenes*, utilizando como adjuvante a subunidade B da toxina colérica (CTB), induziu proteção no teste desafio (McARTHUR et al., 2004). A inoculação de uma proteína recombinante de 30 kDa de *Entamoeba histolytica* em hamsters, foi capaz de induzir proteção no desafio com uma dose letal do patógeno (JIMENEZ-DELGADILLO et al., 2004). Uma experiência bem sucedida no desenvolvimento de vacinas de subunidade baseadas em proteínas recombinantes, foi feita com o vírus da hepatite B, cuja proteína do capsídeo foi sintetizada em *Saccharomyces cerevisiae*. A proteína foi obtida em grandes quantidades e, quando inoculada em macacos, protegeu os animais contra a hepatite B. Essa vacina recombinante foi aprovada para utilização em humanos e já é administrada há vários anos (BROWN, 2003).

A imunização de hamsters com uma fração da membrana *L. interrogans* contendo as proteínas OmpL1 e LipL41, demonstrou sinergismo entre estas duas proteínas na proteção. O índice de sobrevivência dos animais vacinados foi de 71% para a combinação das proteínas, em comparação com o grupo controle, onde 25% dos animais sobreviveram. Um fato interessante é que as proteínas recombinantes administradas individualmente ou em conjunto não foram protetoras, sugerindo que

a maneira com que OmpL1 e LipL41 estão associadas à membrana é importante para determinar a imunoproteção (HAAKE et al., 1999).

Quando comparadas com as vacinas recombinantes vetorizadas e de DNA, as vacinas de subunidade têm a clara vantagem de serem licenciadas pelos órgãos de regulamentação competentes (CLARK; CASSIDY-HANLEY, 2005). Além disso, vacinas recombinantes de subunidade apresentam pouco ou nenhum efeito colateral (KOIZUMI; WATANABE, 2005).

Contra a leptospirose os antígenos mais efetivos como vacinógenos são proteínas da OM de *Leptospiras* patogênicas (KOIZUMI; WATANABE, 2005). Já foi comprovado que o soro de pacientes com leptospirose apresenta anticorpos contra vários destes antígenos protéicos (GUERREIRO et al., 2001).

1.6 Lipoproteínas de *L. interrogans* como potenciais vacinógenos

As OMPs (*outer membrane proteins* – proteínas de membrana externa) expostas na superfície das leptospiras são tidas como potenciais vacinógenos. Dois tipos de OMPs foram caracterizados; as porinas, que são OMPs transmembrana e as lipoproteínas que estão ancoradas no espaço extracelular ou periplasmático da OM por ácidos graxos covalentemente ligados a uma cisteína amino-terminal (ZUERNER et al., 2000). Este resíduo de cisteína é precedido por uma seqüência sinal, indicando a lipidação das proteínas (HAAKE, 2000).

O fator característico de todas as lipoproteínas bacterianas é a seqüência sinal na extremidade N-terminal seguida por uma cisteína (HAYASHI; WU, 1990). A seqüência sinal é clivada por uma sinal peptidase II (SPaseII), também chamada lipoproteína sinal peptidase (Lsp). Estes peptídeos sinais das lipoproteínas são similares aos peptídeos sinais das proteínas secretadas, que são clivados pela enzima sinal peptidase I (SPase I) (JUNCKER et al., 2003). A biossíntese das lipoproteínas consiste de três etapas: a transferência de um diacilglicerídeo pela diacilgliceril transferase, para o grupo sulfidril da cisteína de uma prolipoproteína inalterada, clivagem do peptídeo sinal pela SPase II, formando uma apolipoproteína e, por fim, acetilação do grupo α -amino na porção N-terminal da apolipoproteína (SANKARAN; WU, 1994).

A divergência na seqüência das lipoproteínas de espiroquetas, em relação às demais bactérias, inclui a região “lipobox” do peptídeo sinal, presente na porção C-terminal. Esta região é reconhecida pela enzima de modificação lipídica (SETUBAL

et al., 2006) e modificações nesta seqüência “lipobox”, resultam diferenças nas especificidades de sítio ativo das enzimas diacilgliceril transferase e Spase II, que transfere o grupo diacilgliceril para a cisteína e remove o peptídeo sinal, respectivamente (PAETZEL; DALBEY; STRYNADKA, 2002). A região C-terminal ou “lipobox” das espiroquetas possui quatro aminoácidos e compreende a seguinte seqüência: – (Leu, Ala, Ser)₋₄ – (Leu, Val, Phe, Ile)₋₃ – (Ile, Val, Gly)₋₂ – (Ala, Ser, Gly)₋₁ – Cys₊₁ – (HAAKE, 2000; SETUBAL et al., 2006).

As lipoproteínas bacterianas constituem um grande grupo de proteínas com várias funções, tanto estruturais como funcionais, como: adesinas, enzimas, proteínas de transporte, proteínas ligantes, toxinas e uma variedade de funções envolvidas com a virulência (MADAN; SANKARAN, 2002). Lipoproteínas de espiroquetas têm demonstrado ser antígenos capazes de induzir uma resposta imune protetora (HAAKE, 2000), confirmando sua importância na patogênese das leptospiros. Nestes microrganismos, as lipoproteínas são, comprovadamente, as mais proeminentes proteínas que compõem sua membrana celular. Exemplos dessa abundância são as proteínas OspA de *Borrelia burgdorferi*, causador da doença de Lyme, Tpp47 de *Treponema pallidum*, causador da sífilis e LipL32 componente da OM das espécies patogênicas de *Leptospira* (HOWE; MAYER; BARBOUR, 1985; CHAMBERLAIN et al., 1988; HAAKE et al., 2000).

O seqüenciamento do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, desenvolvido na China (REN et al., 2003) e no Brasil (NASCIMENTO et al., 2004b), lançaram a base para a era pós-genoma. Este trabalho relacionou mais de 264 ORFs (*open reading frame* – fase aberta de leitura), que codificam proteínas associadas à membrana (NASCIMENTO et al., 2004a).

Atualmente o número de lipoproteínas de superfície celular de *Leptospira* caracterizadas é pequeno, são elas; LipL21, LipL31, LipL32, LipL36, LipL41, LipL45 e LipL48 (SHANG; SUMMERS; HAAKE, 1996; HAAKE et al., 1998; HAAKE et al., 2000; HAAKE; MATSUNAGA, 2002; MATSUNAGA et al., 2002; CULLEN et al., 2003). Estas lipoproteínas foram assim denominadas, com base em sua aparente massa molecular, de acordo com os critérios adotados para nomenclatura das proteínas de *Treponema* (NORRIS, 1993). Por exemplo, a primeira lipoproteína de leptospira que foi nomeada de acordo com esta nomenclatura foi LipL41, de acordo com sua aparente massa molecular de 41 kDa.

Estudos de caracterização da proteína LipL41 demonstraram que ela se encontra exposta na superfície bacteriana de organismos intactos e é altamente conservada entre leptospiros patogênicos, sendo expressa durante a infecção (SHANG; SUMMERS; HAAKE, 1996), assim como LipL21 (CULLEN et al., 2003).

A proteína LipL36 descrita por Haake e colaboradores (1998), é uma proteína expressa durante o crescimento *in vitro*, mas que *in vivo* possui seus níveis de expressão diminuídos, o que foi comprovado durante a infecção em mamíferos. Estudos também demonstraram não haver produção de anticorpos protetores específicos contra esta proteína experimentalmente em hamsters (BARNETT et al., 1999), o que talvez seja devido ao fato de LipL36 estar ancorada na parte interna da OM não sendo, portanto, uma proteína exposta (SHANG; SUMMERS; HAAKE, 1996; HAAKE, 2000; ZUERNER et al., 2000).

LipL45 foi descrita como uma proteína associada à virulência da *Leptospira*, pois é detectada somente em culturas de baixa passagem, não sendo expressa em cultivos atenuados. Esta proteína é expressa durante a infecção (MATSUNAGA et al., 2002).

A proteína LipL48 foi caracterizada como componente da OM de *Leptospira* (HAAKE; MATSUNAGA, 2002), no entanto, ela não foi identificada como componente do subconjunto de OMPs expostas na superfície desta bactéria (CULLEN et al., 2005). Isto sugere que esta proteína está localizada na porção interna da OM, como a LipL36 (HAAKE et al., 1998) e a LipL31, que também são descritas como pertencentes à membrana interna das leptospiros (HAAKE; MATSUNAGA, 2002).

Até o presente momento, a mais proeminente proteína de membrana de leptospira reportada é LipL32. Ela é expressa tanto em cultivos *in vivo* quanto *in vitro*, sendo sua seqüência e expressão altamente conservada entre as espécies patogênicas de *Leptospira*. Desta forma, LipL32 é apontada como o antígeno mais importante na patogênese, diagnóstico e prevenção da leptospirose (HAAKE et al., 2000; GUERREIRO et al., 2001; BRANGER et al., 2001). Dentre as lipoproteínas acima relacionadas, as três maiores em ordem de abundância na superfície celular são: LipL32, LipL21 e LipL41 (CULLEN et al., 2005).

1.7 Vacinologia reversa

A capacidade de determinação da seqüência genômica completa de diversos organismos, abriu as portas para uma nova metodologia de desenho racional de vacinas, que é relevante no tratamento e prevenção de uma série de infecções (KOIZUMI; WATANABE, 2005). As seqüências completas dos genomas são transformadas em algoritmos computacionais, para que sejam avaliadas *in silico*, oferecendo uma nova estratégia para identificação de antígenos potenciais. Esta metodologia de análise recebe o nome de vacinologia reversa e vem surgindo como uma revolução na área de desenvolvimento de vacinas (RAPPUOLI; COVACCI, 2003; SERRUTO et al., 2004).

Uma série de patógenos já teve seu genoma analisado na busca de alvos potenciais para uso diagnóstico e desenvolvimento de vacinas. Dentre eles podemos citar: o grupo B de *Meningococcus*, grupo B de *Streptococcus*, *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*, vírus da hepatite C, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria meningitidis*, entre outros (RAPPUOLI, 2000; SERRUTO et al., 2004; GAMBERINI et al., 2005; KOIDE et al., 2005; MAIONE et al., 2005).

A análise do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e a escolha racional de seqüências que codificam proteínas associadas à membrana, estão entre as novas estratégias de avaliação e caracterização de imunógenos para o desenvolvimento de uma vacina protetora e para o uso em testes diagnósticos.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar experimentalmente lipoproteínas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (FIOCRUZ, BA), quanto a sua capacidade de induzir uma resposta imune específica, potencialmente protetora contra a leptospirose, quando utilizadas como vacina de subunidade.

2.1 Objetivos específicos

- Identificar *in silico* antígenos potenciais para a construção da vacina contra a leptospirose, com base no método de Vacinologia Reversa;
- Clonar e expressar os genes selecionados e purificar em larga escala as proteínas eleitas (LIC11058, LIC10054, LIC20172, LIC13059, LIC11567, LIC10091, LIC10009 e LIC13305), para testá-las como uma vacina recombinante de subunidade;
- Inocular camundongos com as proteínas recombinantes, para avaliar a resposta imune humoral através de ELISA;
- Verificar a presença de anticorpos específicos contra as proteínas alvos selecionadas, no soro de camundongos inoculados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130;
- Avaliar se as proteínas alvo são reconhecidas pelo soro humano de pacientes com leptospirose;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas, cultivo e extração de DNA

O isolado *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni, FIOCRUZ L1-130 (NASCIMENTO et al., 2004), foi fornecido por Dr. Albert I. Ko (CPqGM/FIOCRUZ/BA). A referida cepa foi cultivada a 30° C em meio Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (EMJH) (Difco Laboratories) enriquecido com 8% de albumina bovina. Para extração do DNA genômico a cultura foi centrifugada a 10000 g, ressuspendida em solução salina 1% e fervida por 10 minutos. *Escherichia coli* TOP10F (Invitrogen) utilizada como sistema de expressão, foi cultivada a 37° C em ágar Luria-Bertani (LB) (Difco Laboratories) suplementado, quando necessário, com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina.

3.2 Preparo de células competentes e transformação bacteriana

Células competentes de *E. coli* TOP10F (Invitrogen) foram preparadas para eletroporação conforme descrito por Sambrook e Russell (2001), com algumas modificações. Uma alíquota da cultura de *E. coli* TOP10F (Invitrogen) armazenada a – 70° C, foi descongelada e semeada em placa de ágar LB. A placa foi incubada a 37° C por um período de 16 a 24 horas (*overnight*). Do crescimento resultante, uma colônia isolada foi semeada em 20 mL de LB líquido e incubada a 37° C em agitador orbital a 225 rpm, *overnight*. Após, o cultivo foi inoculado em um frasco de 500 mL de capacidade, contendo 200 mL de LB líquido e cultivado a 37° C, sob agitação (225 rpm), até atingir a densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀) de 0,5 a 0,7 (cerca de 5 x 10⁷ cél.mL⁻¹). Ao final do período de incubação o cultivo foi mantido em banho de gelo por 20 minutos e colocado em tubos de centrifuga estéreis com capacidade para 250 mL, sendo centrifugado (4000 g, 10 minutos a 4° C). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido em 200 mL de água ultrapura estéril gelada (4° C). A amostra foi mais uma vez centrifugada sob as mesmas condições, o *pellet* ressuspendido em 100 mL de glicerol 10% estéril a 4° C, novamente centrifugado e ressuspendido em 2 mL de glicerol 10% estéril. As células foram fracionadas em tubos de microcentífuga de 1,5 mL de capacidade (alíquotas de 50 µL) e congeladas a – 70° C. O protocolo de transformação utilizado foi adaptado de Sambrook e Russell (2001). Para cada processo de transformação utilizou-se 50 µL de células competentes de *E. coli* TOP10F (Invitrogen) e 2 µL do produto de ligação.

Utilizaram-se ponteiras estéreis para misturar as amostras, agitou-se gentilmente e transferiu-se para uma cubeta de eletroporação (0,2 cm de largura) (Bio-Rad Laboratories), previamente resfriada em gelo. A cubeta foi encaixada nos eletrodos do eletroporador (Bio-Rad Laboratories) ajustado para as seguintes condições: 25 μ FD de capacitância, 200 Ohms de resistência e a 2,5 kV de voltagem. Após o processo de eletroporação adicionou-se imediatamente 450 μ L de meio LB líquido e transferiu-se para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL de capacidade, que foi incubado em agitador orbital a 225 rpm a 37° C por 1 hora. O cultivo foi plaqueado em ágar LB sólido acrescido de 100 μ g.mL⁻¹ de ampicilina e as placas incubadas a 37° C, *overnight*.

3.3 Identificação das proteínas candidatas a vacina: análise *in silico*

Genes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (FIOCRUZ, BA) que codificam lipoproteínas, foram selecionados no banco de dados GenBank e avaliados com ferramentas de bioinformática. O programa DOLOP (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/dolop/>) foi utilizado para prever quais seqüências presentes no genoma codificam lipoproteínas e se estas são homólogas a proteínas de superfícies previamente caracterizadas em outros organismos. O programa PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>) foi utilizado para avaliar a localização das proteínas na bactéria. O programa Vector NTI 8.0 (Informax inc.) serviu como ferramenta na identificação de regiões hidrofóbicas das proteínas e também de suas seqüências sinais. A presença de domínios transmembrana nas proteínas alvo foi avaliado através do programa TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>). Neste trabalho, os genes que codificam as proteínas de interesse são referidos de acordo com a nomenclatura genômica de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, LIC.

3.4 Desenho dos *primers* e amplificação dos genes

A seqüência genômica de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (FIOCRUZ, BA) foi obtida no GenBank sob o número de acesso NC005823. Para desenho dos *primers* que foram utilizados na amplificação dos genes, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizou-se o programa Vector NTI 8.0 (Informax inc.). Na Tabela 1 encontra-se a relação das seqüências dos *primers*, com seus respectivos sítios para enzimas de restrição e os números de acesso das proteínas no GenBank. Cada um dos genes foi amplificado do DNA

genômico de *L. interrogans* L1-130, utilizando a enzima Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen) e *primers* especialmente projetados, os quais foram utilizados de acordo com especificações do fabricante (MWG Biotech, USA). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo 50 ng de DNA genômico, 6 ng.µL⁻¹ de cada oligonucleotídeo, 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM e 10% de tampão 10 x. A reação foi realizada em termociclador onde as amostras foram submetidas às seguintes etapas: desnaturação inicial (95° C, 5 min) seguida de 35 ciclos de desnaturação (95° C, 1 min), anelamento (50° C, 1 min), extensão (72° C, 1 min) e, ao término destes 35 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo de extensão final (72° C, 7 min).

Tabela 1: Seqüência dos *primers* utilizados nas ampliações por PCR, enzimas de restrição utilizadas na clonagem e número de acesso das proteínas no GenBank.

Genes	Seqüência dos <i>primers</i> *	Enzima	AN
LIC11058	F CGGGATCCATTCAAGAAGAAGATGAG	<i>Bam</i> HI	AAS69665
	R CCCAAGCTTCGAATTGTAACGTTGGTAT	<i>Hind</i> III	
LIC10054	F TTTTTTGGATCCGAGTCTAAACGAAG	<i>Bam</i> HI	AAS68691
	R TTTTTTAAGCTTCACCGTATTCTTGTC	<i>Hind</i> III	
LIC20172	F CGGGATCCGATACGGACAAGGACGGG	<i>Bam</i> HI	AAS72200
	R CCCAAGCTTTTCGGAATCCTCGTCCGG	<i>Hind</i> III	
LIC13059	F CGGGATCCGAATCCATGGTATATTAT	<i>Bam</i> HI	AAS71608
	R CCCAAGCTTACTTTGACGAATCAATGC	<i>Hind</i> III	
LIC11567	F CGGGATCCAACAGATTGATTTCGTAAG	<i>Bam</i> HI	AAS70163
	R CCCAAGCTTCTTTTTGTATTCCACAAG	<i>Hind</i> III	
LIC10091	F CGGGATCCAAACTATTTTTAGTCTCCTTTG	<i>Bam</i> HI	AAS68725
	R CCCAAGCTTGATTTCAAAGAAGTATG	<i>Hind</i> III	
LIC10009	F TTTTTTTGATCAACAAGAAGCGCAGATCT	<i>Bcl</i> I	AAS68646
	R CCCAAGCTTGAATCATCCTGTTTA	<i>Hind</i> III	
LIC13305	F TTTTTTTGATCAAACTATGATCGTGAC	<i>Bcl</i> I	AAS71847
	R TTTAAGCTTGATATCACCACCCAAA	<i>Hind</i> III	

* Em vermelho estão destacados os sítios de restrição das enzimas.

LIC – *Leptospira interrogans* Copenhageni

AN – número de acesso das proteínas no GenBank

F/R – *primer forward e reverse*

3.5 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes

A clonagem dos genes foi realizada conforme descrito por Sambrook e Russell (2001), com algumas modificações. Os fragmentos amplificados por PCR foram clonados no vetor pQE30 (Qiagen) que possui as seguintes características: origem de replicação em *E. coli*, sítio de múltipla clonagem, gene de resistência ao antibiótico ampicilina, operador *lac* e promotor do fago T5, que é reconhecido pela RNA polimerase de *E. coli*. Além disso, esse vetor permite a expressão das

proteínas recombinantes fusionadas a uma cauda de seis resíduos de histidinas em sua porção N-terminal. Os genes amplificados por PCR foram checados em gel de agarose 1% e purificados utilizando o GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, seguindo orientações do fabricante (Amersham Biosciences). Os fragmentos foram digeridos com suas respectivas enzimas de restrição (Tabela 1) e re-purificados com GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences). O vetor pQE30 foi digerido com enzimas de restrição correspondentes aos genes de interesse (*Bam*HI e *Hind*III ou *Bcl*I e *Hind*III), desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina (CIP) (Boehringer Mannheim) e purificado com GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences). Para a reação de ligação foi utilizada a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e concentrações equimolares de inserto e vetor. Em massa as concentrações ideais são de 1 µg de DNA do vetor e 100 ng de DNA do inserto. A reação de ligação foi mantida a 16° C por 2 horas. O produto da ligação foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* TOP10F, como descrito. As colônias que cresceram nas placas, oriundas do processo de transformação, foram submetidas a um processo de triagem rápida pelo método microprep (JOUGLARD et al., 2002). Os clones caracterizados como recombinantes nesta triagem, ou seja, que apresentavam o plasmídeo pQE30 mais o inserto, foram selecionados e cultivados em 5 mL de LB líquido acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina, 37° C, *overnight*. Deste cultivo utilizou-se 3 mL para extração de DNA plasmidial através do GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences) e o DNA resultante desta extração foi submetido a digestão com enzimas de restrição para checar a presença e orientação do inserto. O restante do cultivo foi utilizado como inóculo em 9 mL de LB líquido acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina e a cultura incubada a 37° C até atingir a densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀) de 0,5 a 0,7. Neste momento, a cultura foi fracionada em duas alíquotas de igual volume (5 mL), sendo uma induzida com 1 mM de isopropil β-D-tiogalactosídeo (IPTG) e a outra servindo de controle negativo (não induzido), ambas incubadas durante 3,5 horas, para que tanto as amostras induzidas quanto as não induzidas apresentassem o mesmo número de células. Ao final do cultivo coletou-se uma alíquota (1 mL) de cada amostra, centrifugou-se 14000 g por 1 minuto e o *pellet* foi utilizado para verificar a expressão em pequena escala das proteínas recombinantes, através de uma eletroforese em um gel SDS-PAGE com extrato protéico total de cada clone, como descrito por Sambrook e Russell (2001). A

expressão das proteínas recombinantes foi também confirmada através da técnica de *Western blotting* (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) utilizando anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:3000, conforme instruções do fabricante.

3.6 Purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes foram expressas em larga escala e purificadas através de um sistema de cromatografia de afinidade utilizando o sistema de cromatografia líquida de baixa pressão ÄKTAPrime (Amershan Biosciences). Para purificação das proteínas em larga escala adicionou-se 50 mL de inóculo em 500 mL de LB líquido acrescido de 100 µg.mL⁻¹. A cultura foi então cultivada em agitador orbital a 200 rpm a 30° C até atingir densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀) entre 0,5 – 0,7, quando então foi acrescida de 1 mM de IPTG e incubada novamente sob as mesmas condições por 3,5 horas. Após o período de incubação a cultura foi centrifugada a 7000 g por 20 minutos a 4° C. O *pellet* foi ressuscitado em um tampão de solubilização acrescido de 8 M de uréia e submetido a agitador orbital a 60 rpm por 18 horas a temperatura ambiente. As células foram então lisadas por três sucessivos ciclos de sonicação (30 s, 20 kHz) e centrifugadas a 10000 g por 60 minutos a 4° C e o sobrenadante coletado e filtrado em filtro 0,8 µm (Millipore). As amostras foram então submetidas à cromatografia de afinidade no ÄKTAPrime (Amershan Bioscience) utilizando uma coluna de Ni⁺²-Sephacrose (Amersham Bioscience). No processo de purificação as proteínas inespecíficas (proteínas de *E. coli*) foram retiradas com aproximadamente 200 mL de um tampão de lavagem (8 M de uréia; 200 mM de NaH₂PO₄; 0,5 M de NaCl; 5 mM de imidazole; pH 8,0). Após a passagem do tampão de lavagem pelo sistema, as proteínas foram eluídas em cerca de 20 mL de um tampão de eluição, contendo uma concentração alta de imidazole (8 M de uréia; 200 mM de NaH₂PO₄; 0,5 M de NaCl; 200 mM de imidazole; pH 8,0). Conforme ocorreu a entrada do tampão de eluição no sistema e a passagem deste pela coluna de purificação Ni⁺²-Sephacrose, carregada com 50 mM de níquel, as proteínas foram eluídas através de um gradiente de imidazole, onde as proteínas inespecíficas que ligaram na coluna, foram retiradas com concentrações menores de imidazole, em relação as recombinantes. As eluições das proteínas foram coletadas em frações de 1 mL e submetidas a um SDS-PAGE 15%.

3.7 Diálise lenta das proteínas recombinantes

As alíquotas coletadas contendo as proteínas recombinantes foram dialisadas de forma lenta utilizando-se sacos de celulose para diálise (25 mm x 16 mm) (Sigma), que possuem poros e permitem a troca de íons e sais em solução, mas que impedem a passagem das proteínas. Os sacos de diálise, contendo as proteínas, foram acondicionados em um kitazato com capacidade para 1 L, contendo 500 mL do tampão de eluição (8 M de uréia; 200 mM de NaH_2PO_4 ; 0,5 M de NaCl; 200 mM de imidazole; pH 8,0). Utilizou-se uma bomba peristáltica injetando tampão fosfato salino 1x (PBS) com velocidade de $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, para diluir o tampão de eluição 8 M, fazendo com a concentração de uréia reduzisse a metade em aproximadamente 4 horas. As proteínas foram dialisadas contra 12 L de PBS 1x, em sistema de fluxo contínuo, por 92 horas, 4° C , deixando as proteínas em uma concentração final de aproximadamente 2 mM de uréia.

3.8 Quantificação das proteínas recombinantes

A quantificação das proteínas foi realizada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) que se baseia na complexação do reagente de Bradford com as cadeias polipeptídicas das proteínas, comparado a uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). O teste foi realizado em microplacas de 96 cavidades (Nunc-Immuno™ Plate PolySorp™ Surface, NUNC™ Brand Products) adicionando-se em 200 μL de reagente de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G250 0,01%; etanol absoluto 4,7%; ácido fosfórico 8,5% em água) e 5 μL de cada amostra em duplicata. Para realização da curva utilizou-se BSA com densidade óptica de $0,91 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. A leitura foi feita em leitor de ELISA com filtro 540 nm. O cálculo dos valores obtidos foi realizado utilizando-se a equação da reta, onde o “y” correspondia à média da amostra e o “x” a concentração da amostra, sendo o resultado obtido deste cálculo multiplicado pelo valor de correção da curva (1,7).

3.9 Seqüenciamento dos vetores construídos

Os vetores construídos foram seqüenciados por eletroforese capilar utilizando di-deoxi-nucleotídeos marcados em um seqüenciador MegaBACE (Amersham Biosciences). Os dados oriundos do seqüenciamento foram compilados e analisados no programa de alinhamento de seqüências ContigExpress (Informax inc.) e Basic

Local Alignment Search Tool (BLAST), localizado no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.10 Imunização dos camundongos

Camundongos BALB/c (Biotério Central, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil) de 5 a 8 semanas de idade foram imunizados com as proteínas recombinantes. Utilizou-se 10 grupos com 5 animais cada, sendo 8 grupos para as vacinas de subunidades e 2 para os controles. Cada animal recebeu as proteínas recombinantes em duas doses de 100 µg cada, via intramuscular, com intervalo de 21 dias entre as doses. Utilizou-se neste experimento dois controles: um positivo, onde os animais foram inoculados com a bacterina de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (FIOCRUZ, BA), recebendo duas doses via intraperitoneal de 10^9 cél.mL⁻¹ cada e um controle negativo, onde utilizou-se somente o adjuvante na concentração de 15% em solução salina estéril. O adjuvante utilizado foi o hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] na concentração de 15% do volume aplicado, tanto para as proteínas recombinantes como para os controles. Na Tabela 2 pode-se visualizar o esquema de vacinação utilizado neste experimento. As coletas de sangue foram realizadas no dia zero e a cada 21 dias após as inoculações. O sangue foi coletado a partir do plexo venoso retrocular dos animais, sendo incubado 1 hora a 37° C e por mais 1 hora a 4° C. Centrifugou-se o sangue (10 min; 4000 g) e o soro foi coletado e armazenado a - 20° C.

Tabela 2: Esquema de vacinação dos animais utilizados para avaliação da resposta imune das vacinas de subunidade.

Vacinas de subunidade	1ª dose (0 dias)	2ª dose (21 dias)	Via de inoculação	Nº de animais
LIC11058r	86 µL + 13 µL adj.	86 µL + 15 µL adj.	IM	5
LIC10054r	123 µL + 19 µL adj.	123 µL + 19 µL adj.	IM	5
LIC20172r	66 µL + 10 µL adj.	66 µL + 10 µL adj.	IM	5
LIC13059r	117 µL + 18 µL adj.	117 µL + 18 µL adj.	IM	5
LIC11567r	178 µL + 27 µL adj.	178 µL + 27 µL adj.	IM	5
LIC10091r	199 µL + 30 µL adj.	199 µL + 30 µL adj.	IM	5
LIC10009r	50 µL + 8 µL adj.	50 µL + 8 µL adj.	IM	5
LIC13305r	217 µL + 33 µL adj.	217 µL + 33 µL adj.	IM	5
Controle + (Bacterina)	10^9 cél. <i>L. interrogans</i> (1 mL + 15% adj.)	10^9 cél. <i>L. interrogans</i> (1 mL + 15% adj.)	IP	5
Controle – [Al(OH) ₃]	85 µL salina + 15 µL adj.	85 µL salina + 15 µL adj.	IM	5

IM – via de inoculação intra-muscular

IP – via de inoculação intraperitoneal

Adj. – Adjuvante hidróxido de alumínio [Al(OH)₃]

3.11 Avaliação da resposta imune humoral

A resposta imune humoral dos animais vacinados foi monitorada através de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), no qual foram utilizadas as proteínas recombinantes como antígeno. Microplacas de poliestireno de 96 cavidades (Nunc-Immuno™ Plate PolySorp™ Surface, NUNC™ Brand Products) foram sensibilizadas com 5 µg.mL⁻¹ de proteína recombinante a 4° C, *overnight*, diluídas em tampão carbonato bicarbonato pH 9,8. As placas foram lavadas 3 vezes com tampão salino fosfato pH 8,0 acrescido de Tween 20 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com caseína 0,25% por 1 hora a 37° C. Após mais 3 lavagens com PBS-T adicionou-se os soros dos animais inoculados com as proteínas recombinantes e com os controles, na diluição 1:20 em PBS-T, incubou-se por mais 1 hora a 37° C e, após nova lavagem das placas, adicionou-se o soro anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase (DAKO) na diluição 1:2000 em PBS-T, incubando-se por mais 1 hora a 37° C. Procedeu-se 5 lavagens com PBS-T e adicionou-se o substrato ELISA-OPD Peroxidase (Sigma), incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente em local escuro e procedeu-se a leitura da densidade óptica a 450 nm em leitor de ELISA Multiskan MCC/340 (Titertek). As amostras de soro de cada animal foram avaliadas em triplicata no ELISA.

3.12 Reatividade de soro imune contra *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 com as proteínas recombinantes

O reconhecimento das proteínas recombinantes pelo soro de camundongos imunizados com uma bacterina (célula inteira de *L. interrogans* Copenhageni L1-130 inativada) foi avaliado através de ELISA. Para sensibilização da microplaca de poliestireno de 96 cavidades (Nunc-Immuno™ Plate PolySorp™ Surface, NUNC™ Brand Products) foram utilizados 5 µg.mL⁻¹ de proteína recombinante, diluída em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6, 4° C, *overnight*. A placa foi lavada três vezes com PBS-T e bloqueada com 1% de caseína a 37° C por 1 hora. Após adicionou-se o soro imune dos camundongos imunizados com a bacterina, na diluição 1:20, incubando-se 1 hora a 37° C. Procedeu-se nova lavagem da placa (3 vezes com PBS-T) e adicionou-se o conjugado anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase (DAKO), na diluição 1:2000, incubando-se por 1 hora a 37° C. Ao final deste período de incubação, a placa foi lavada 5 vezes com PBS-T e acrescida do substrato ELISA-OPD Peroxidase (Sigma). As placas foram incubadas a

temperatura ambiente, em local escuro, por 15 minutos e procedeu-se a leitura da densidade óptica a 450 nm, em leitor de ELISA Multiskan MCC/340 (Titertek). Nesta avaliação, foram utilizados os seguintes controles para sensibilização da placa: proteína recombinante LipL32 ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e bactéria L1-130 ($5 \times 10^7 \text{ cél.mL}^{-1}$) confrontados com o soro imune dos camundongos imunizados com a bactéria e ainda os controles considerados negativos, onde a placa foi sensibilizada com *pool* das proteínas recombinantes ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a bactéria L1-130 ($5 \times 10^7 \text{ cél.mL}^{-1}$), que foram avaliados quanto a reatividade com o soro pré-imune destes animais. Todos os reativos foram adicionados a placa em um volume de 50 μL por cavidade e para lavagem das cavidades acrescentou-se 200 μL de PBS-T 1x.

3.13 Análise estatística

Para calcular as diferenças estatísticas obtidas no ensaio de avaliação da resposta imune humoral dos animais vacinados, realizada através de ELISA, foi utilizado o Teste T de Student, onde o valor de P menor que 0,05 foi considerado significativo.

3.14 Reconhecimento das proteínas pelo soro de pacientes com leptospirose

As proteínas recombinantes purificadas e dialisadas foram submetidas a um *Western blotting* (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) com *pool* de soro humano de pacientes com leptospirose. As proteínas purificadas foram submetidas a um SDS-PAGE 15% e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose HybondTM ECLTM (Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada com PBS acrescido de 0,5% de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado, a 4° C, *overnight* e, após este período, lavada 3 vezes com PBS-T e incubada com soro humano de pacientes com leptospirose em fase convalescente com teste de aglutinação microscópica (MAT) com título de 25000, na diluição de 1:100, a temperatura ambiente por 1 hora. A membrana foi então lavada 3 vezes com PBS-T e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Calbiochem), na diluição 1:500 em PBS-T. As bandas foram reveladas com cromógeno $\text{H}_2\text{O}_2/4\text{-cloro-1-naftol}$ (10 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,6; 0,1 mL de cloronaftol; 10 μL de peróxido de hidrogênio). As proteínas também foram testadas contra *pool* de soro humano negativo para leptospirose. As condições para o *Western blotting* nesta análise foram as mesmas descritas acima. A diluição do soro negativo foi de 1:100

4 RESULTADOS

4.1 Identificação *in silico* das proteínas candidatas a vacina de subunidade

Na análise *in silico* do genoma seqüenciado de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (FIOCRUZ, BA), optou-se por selecionar seqüências gênicas que codificam proteínas associadas à superfície celular, pois são potencialmente capazes de induzir resposta imune. Estas seqüências podem ser identificadas nos bancos de dados por similariedade com as de outros microrganismos. Para análise inicial, utilizou-se o programa PSORT na identificação de proteínas associadas à membrana, sendo escolhidas as seqüências que apresentaram um escore mais elevado. Genes envolvidos na codificação de proteínas com função citoplasmática foram excluídos. Neste sentido, foram identificados oito alvos potenciais que codificam lipoproteínas associadas à membrana celular: LIC11058, LIC10054, LIC20172, LIC13059, LIC11567, LIC10091, LIC10009 e LIC13305.

4.2 Amplificação dos genes

Os genes *LIC11058*, *LIC10054*, *LIC20172*, *LIC13059*, *LIC11567*, *LIC10091*, *LIC10009* e *LIC13305* foram analisados através do programa Vector NTI 8.0 (Informax inc.) e os *primers* desenhados para amplificar regiões mais hidrofílicas da proteína. Regiões hidrofóbicas foram evitadas, pois tendem a dificultar o processo de purificação e manutenção destas proteínas na forma solúvel. Regiões gênicas que codificam a seqüência sinal das lipoproteínas também foram excluídas. Convém ressaltar, que dos oito genes clonados, somente dois deles (*LIC11567* e *LIC10009*) foram clonados inteiros, com exclusão apenas da seqüência sinal. Os demais tiveram somente as regiões mais hidrofílicas e antigênicas clonadas. O tamanho dos genes inteiros e dos recombinantes, bem como a massa molecular das proteínas resultantes encontra-se na tabela 3. Na Figura 1 pode ser visualizado o gel de agarose com os genes amplificados através de PCR.

Tabela 3: Tamanho dos genes inteiros e recombinantes e massa molecular das proteínas nativas e recombinantes.

Genes	Tamanho dos genes (pb)		Massa molecular proteínas (kDa)	
	Inteiro	Recombinante	Nativa	Recombinante
<i>LIC11058</i>	597	424	22,7	17,3
<i>LIC10054</i>	2154	833	74,0	32,1
<i>LIC20172</i>	966	742	35,7	28,1
<i>LIC13059</i>	696	341	26,7	14,4
<i>LIC11567</i>	375	323	14,6	13,9
<i>LIC10091</i>	1044	341	40,7	14,6
<i>LIC10009</i>	738	630	27,8	24,8
<i>LIC13305</i>	876	498	33,6	20,3

pb – pares de bases
kDa – kilodaltons

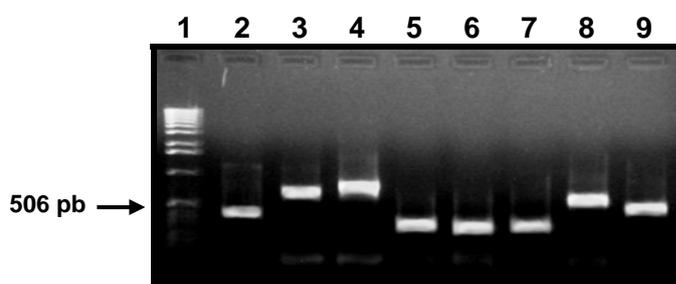


Figura 1 – Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1%. Coluna 1, Marcador de Massa Molecular 1 kb DNA Ladder; coluna 2, *LIC11058* (424 pb); coluna 3, *LIC10054* (833 pb); coluna 4, *LIC20172* (742 pb); coluna 5, *LIC13059* (341 pb); coluna 6, *LIC11567* (323 pb); coluna 7, *LIC10091* (341 pb); coluna 8, *LIC10009* (630 pb) e coluna 9, *LIC13305* (498 pb).

4.3 Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes

Todos os oito genes amplificados foram purificados e ligados ao vetor de expressão pQE30 (Qiagen). As transformações em *E. coli* TOP10F com os produtos das ligações resultaram em vários transformantes. O DNA plasmidial de possíveis clones recombinantes, identificados em uma triagem rápida, foi extraído e digerido com enzimas de restrição, confirmando a presença do inserto (dados não mostrados). Os vetores construídos foram ainda checados por seqüenciamento de DNA. Os clones recombinantes selecionados foram denominados: pQE30/*LIC11058*, pQE30/*LIC10054*, pQE30/*LIC20172*, pQE30/*LIC13059*, pQE30/*LIC11567*, pQE30/*LIC10091*, pQE30/*LIC10009* e pQE30/*LIC13305*. O mapa de restrição destes vetores pode ser visualizado na Figura 2.

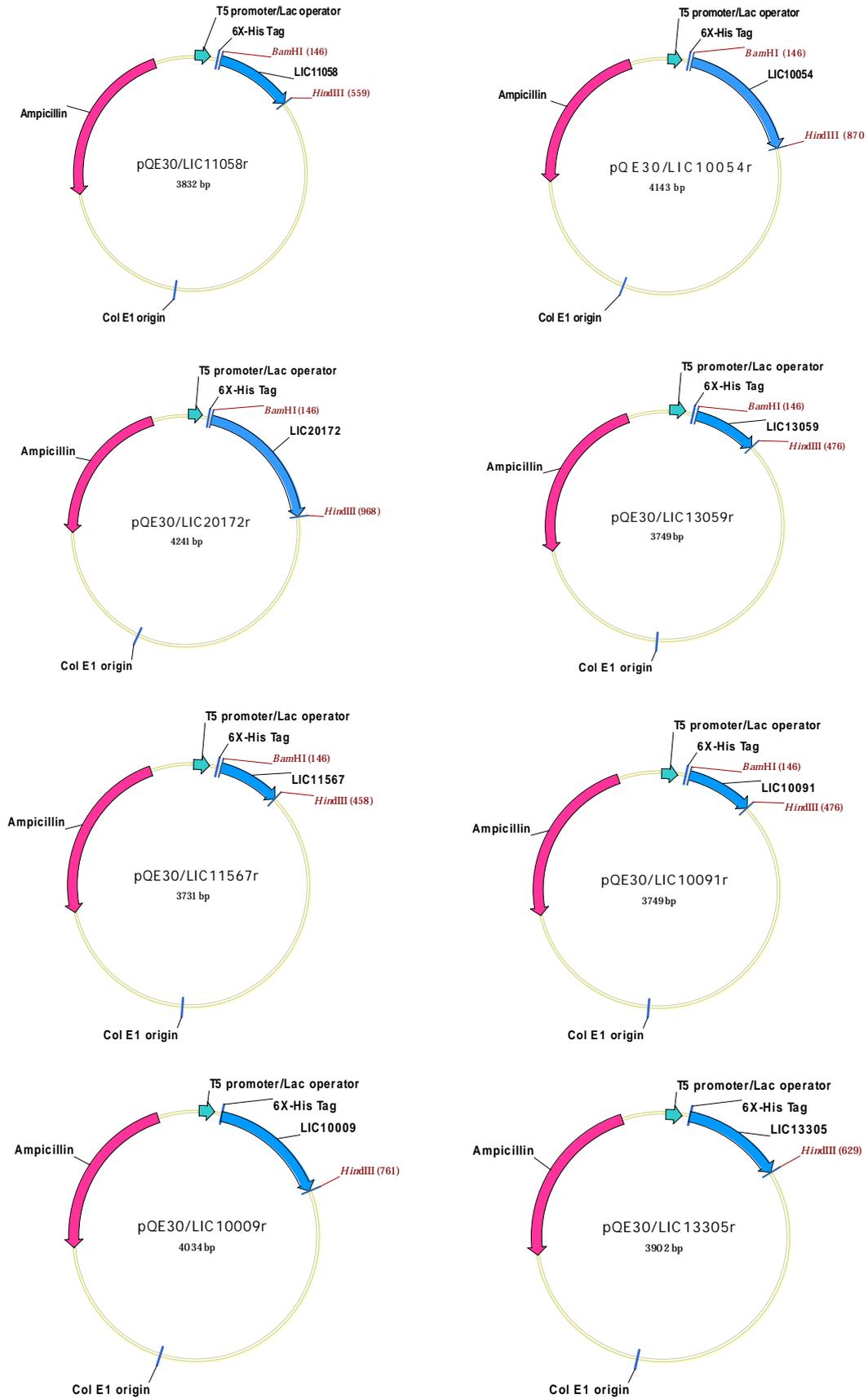


Figura 2 – Mapas dos plasmídeos construídos.

Os vetores transformados em *E. coli* TOP10F permitem a expressão das proteínas recombinantes fusionadas a seis resíduos de histidina em sua porção N-terminal, possibilitando a purificação das mesmas através de cromatografia de afinidade. A checagem da expressão das proteínas recombinantes foi feita em pequena escala. As oito lipoproteínas foram expressas com sucesso na cepa de *E. coli* TOP10F utilizando o vetor pQE30 (Figura 3).

A expressão das proteínas recombinantes foi confirmada através de *Western blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma), na diluição 1:3000, que reconheceu as proteínas recombinantes devido a presença da cauda de histidinas. Este resultado pode ser visualizado na Figura 4.

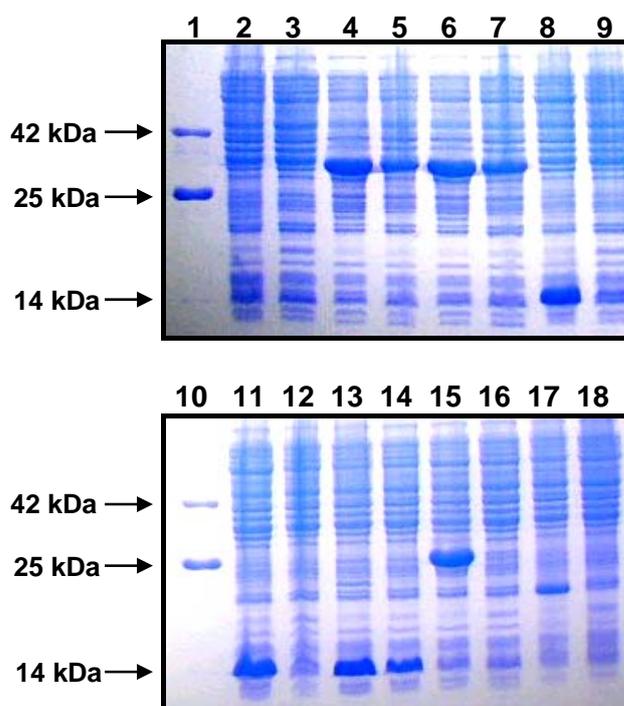


Figura 3: SDS-PAGE 15% corado com *Comassie Blue*, mostrando a cepa de *E. coli* TOP10F expressando as proteínas recombinantes. Coluna 1 e 10, Marcador de Massa Molecular; coluna 2, LIC11058r i (induzido); coluna 3, LIC11058r n.i (não induzido); coluna 4, LIC10054r i; coluna 5, LIC10054r n.i.; coluna 6, LIC20172r i; coluna 7, 20172r n.i.; coluna 8, LIC13059r i; coluna 9, LIC13059r n.i.; coluna 11, LIC11567r i; coluna 12, LIC11567r n.i.; coluna 13, LIC10091r i; coluna 14, LIC10091r n.i.; coluna 15, LIC10009r i; coluna 16, LIC10009r n.i.; coluna 17, LIC13305r i e coluna 18, LIC13305r n.i.



Figura 4: *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:3000. As bandas foram reveladas com DAB/H₂O₂. Coluna 1, Marcador SeeBlue® Plus Pre-Stained Standard 1x; coluna 2, LIC11058r (17,3 kDa); coluna 3, LIC10054r (32,1 kDa); coluna 4, LIC20172r (28,1 kDa); coluna 5, LIC13059r (14,4 kDa); coluna 6, LIC11567r (13,9 kDa); coluna 7, LIC10091r (14,6 kDa); coluna 8, LIC10009r (24,8 kDa); coluna 9, LIC13305r (20,3 kDa) e coluna 10, controle positivo LipL32 (32 kDa).

Após verificar a expressão das proteínas recombinantes em pequena escala, elas foram submetidas ao teste de solubilidade. Nesta avaliação o extrato lisado da cepa de *E. coli* TOP10F, expressando as proteínas recombinantes, foi submetido a um SDS-PAGE 15% para verificar se as proteínas estavam sendo expressas na forma solúvel ou insolúvel, ou seja, as proteínas que estavam presentes no *pellet*, foram consideradas insolúveis e aquelas presentes no sobrenadante, solúveis. Nas oito proteínas testadas, observou-se maior presença no *pellet* celular (dados não mostrados), onde se encontram proteínas mais hidrofóbicas. Portanto, adotou-se um protocolo de purificação para proteínas insolúveis, que utiliza uréia para auxiliar no rompimento das células e solubilização das proteínas expressas na forma de corpúsculos de inclusão. Devido à formação destes corpúsculos, optou-se por crescer as culturas a 30° C, pois a esta temperatura o nível de expressão das proteínas recombinantes é melhor. As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando Ni⁺²-Sepharose, através do sistema de cromatografia líquida de baixa pressão ÄKTAPrime (Amershan Bioscience). As frações coletadas do ÄKTAPrime foram submetidas a um SDS-PAGE 15% para avaliar a purificação das proteínas recombinantes e a possível presença de proteínas inespecíficas. Na Figura 5 pode-se visualizar um gel de poliacrilamida 15% com as oito proteínas recombinantes purificadas através deste sistema.

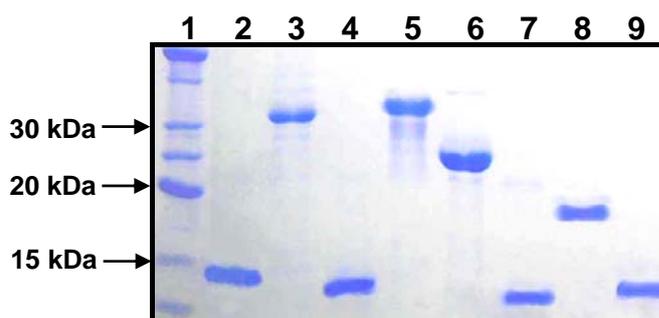


Figura 5: Gel de poliacrilamida 15% corado com *Comassie Blue* mostrando as oito proteínas recombinantes purificadas utilizando o sistema ÄKTAPrime (Ni⁺²-Sepharose). Coluna 1, Marcador BENCHMARK™ Protein Ladder; coluna 2, LIC11058r (17,3 kDa); coluna 3, LIC20172r (28,1 kDa); coluna 4, LIC13059r (14,4 kDa); coluna 5, LIC10054r (32,1 kDa); coluna 6, LIC10009r (24,8 kDa); coluna 7, LIC10091r (14,6 kDa); coluna 8, LIC13305r (20,3 kDa) e coluna 9, LIC11567r (13,9 kDa).

O método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizado na quantificação das proteínas recombinantes purificadas, permitiu calcular o seu rendimento e sua concentração, antes e após a diálise (Tabela 4). A purificação das proteínas rendeu, em volume, uma média de 17,75 mL por proteína, com um rendimento médio de 43,31 mg.L⁻¹, o qual foi medido a partir das concentrações das proteínas antes da diálise. A concentração das proteínas após a diálise variou, algumas proteínas precipitaram com a redução na concentração de uréia, como ocorreu com as LICs 13059r, 11567r, 10091r e 13305r, contudo, a quantidade que se manteve em solução foi suficiente para realizar as imunizações dos camundongos e o restante dos experimentos. As demais (LIC11058r, LIC10054r, LIC20172r e LIC10009r) não precipitaram durante a diálise e mantiveram as mesmas concentrações (Tabela 4).

Tabela 4: Rendimento e concentração das proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* TOP10F e quantificadas pelo método de Bradford.

Proteína	Característica	Volume final (mL)	Rendimento (mg.L ⁻¹)	Concentração* (mg.mL ⁻¹)
LIC11058r	<i>lemA</i>	17	42,84	1,17
LIC10054r	<i>rlpA</i>	14	20,75	0,74
LIC20172r	lipoproteína	18	32,06	0,89
LIC13059r	provável lipoproteína	20	61,32	0,86
LIC11567r	provável lipoproteína	22	69,80	0,56
LIC10091r	provável lipoproteína	10	17,68	0,50
LIC10009r	provável lipoproteína	17	70,84	2,02
LIC13305r	provável lipoproteína	8	31,20	0,47

* - concentração final das proteínas obtida após a diálise

4.4 Resposta imune humoral induzida pelas vacinas de subunidade

A inoculação de duas doses das vacinas foi capaz de induzir uma resposta imune humoral específica nos animais vacinados (Figura 6). Das oito proteínas avaliadas, seis delas (LIC11058r, LIC20172r, LIC13059r, LIC11567r, LIC10091r e LIC10009r) apresentaram, com a primeira dose, uma intensidade de resposta média equivalente, que foi de 0,127 (OD_{450}), em relação ao soro pré-imune dos animais e do grupo controle negativo salina/ $Al(OH)_3$. Estes níveis foram observados no 21° dia após a primeira dose. As outras duas lipoproteínas (LIC10054r e LIC13305r) apresentaram a maior e menor leitura no 21° dia (0,367 e 0,046, respectivamente).

Todas as respostas aumentaram ainda mais com a segunda dose da vacina. As absorvâncias aos 21 dias após a segunda dose da vacina variaram de 0,248 a 0,502, para seis LICs (11058r, 10054r, 20172r, 13059r, 11567r e 10091r). No 42° dia de avaliação, pôde-se observar que a LIC10009r apresentou uma resposta mais elevada, se destacando das demais, com uma absorvância de 0,648. A LIC13305r continuou apresentando os níveis mais baixos de resposta (OD_{450} de 0,079). O grupo controle negativo salina/ $Al(OH)_3$ apresentou uma OD_{450} de 0,049, no 42° dia de avaliação.

Das oito proteínas avaliadas a que demonstrou maior imunogenicidade foi a LIC10009r, com níveis máximos de absorvância de 0,705, observado no 84° dia. Os camundongos inoculados com as LICs 11058r, 10054r, 20172r, 13059r, 11567r e 10091r apresentaram uma OD_{450} máxima de 0,406; 0,495; 0,475; 0,507; 0,265 e 0,361, respectivamente. Estes índices de absorvância foram observados entre o 63° e 84° dias. A LIC13305r apresentou as OD_{450} mais baixas ao longo de todo o experimento, não excedendo 0,101, embora ainda apresentasse aos 105 dias um aumento gradativo da resposta. Todas as oito lipoproteínas avaliadas mantiveram a resposta imune humoral, atingida com a segunda dose da vacina, estável até os 105 dias após a primeira inoculação. A resposta imune apresentada pelos camundongos foi monitorada até 105 dias após a primeira dose da vacina (Figura 6) e, durante este período, os níveis de resposta do grupo controle negativo salina/ $Al(OH)_3$ não excederam a OD_{450} de 0,057. Todos os animais foram avaliados em triplicata nos testes de ELISA, ressaltando que cada grupo era formado por cinco animais.

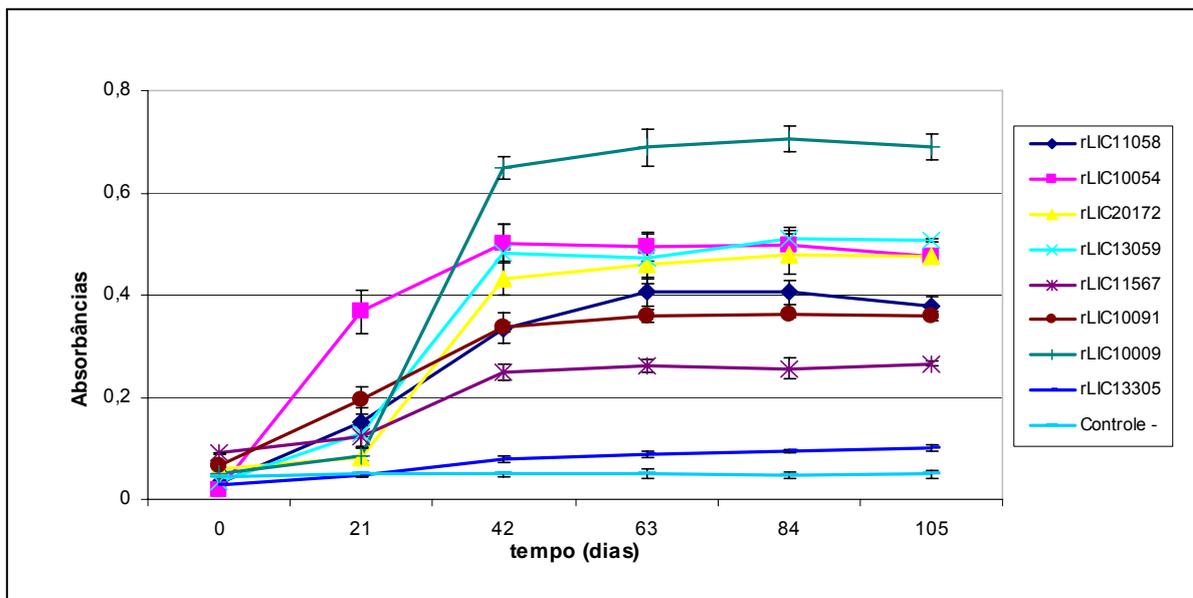


Figura 6 – Resposta imune humoral dos animais inoculados com as proteínas recombinantes e do grupo controle negativo salina/ $\text{Al}(\text{OH})_3$, mensurada através de ELISA. A medida das respostas imunes está expressa em absorbância.

4.5 Reatividade de soro imune contra *L. interrogans* com as proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes foram confrontadas com *pool* de soro imune dos camundongos inoculados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (bacterina), através de um ELISA, com o intuito de testar se estas proteínas são reconhecidas e, assim, confirmar que houve a produção de anticorpos específicos. A figura 7 ilustra os resultados deste experimento. Foi observada uma absorbância média de 0,140, para as proteínas recombinantes alvos testadas contra o soro, indicando haver a produção de anticorpos contra elas pelos camundongos inoculados com a bacterina. O soro pré-imune destes animais foi confrontado com o *pool* das proteínas recombinantes e apresentou uma OD_{450} de 0,040. Nos controles positivos foram verificadas absorbâncias de 0,530 e 0,551, para a proteína LipL32 e a bacterina, respectivamente, em relação ao soro pré-imune dos animais inoculados com a bacterina (OD_{450} 0,085).

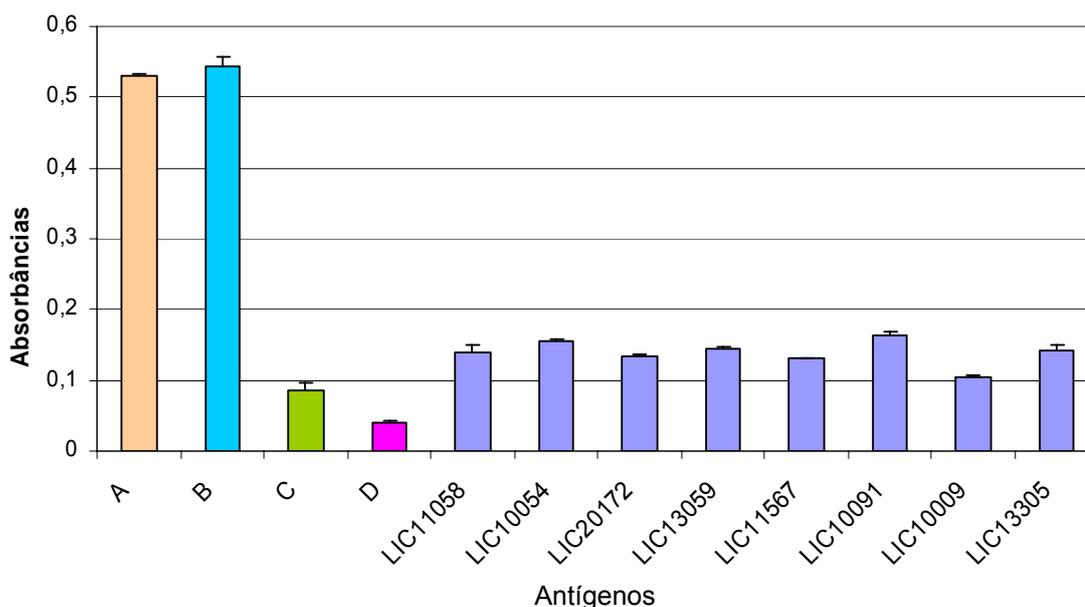


Figura 7 – Reconhecimento das proteínas recombinantes pelo soro imune de camundongos inoculados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (bacterina). A medida das respostas imunes está expressa em absorbância. Controles positivos: coluna A, proteína recombinante LipL32 ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e coluna B, bacterina ($5 \times 10^7 \text{ cél.mL}^{-1}$) confrontados com o soro imune dos camundongos imunizados com a bacterina. Controles negativos: coluna C, bacterina ($5 \times 10^7 \text{ cél.mL}^{-1}$) e coluna D, *pool* proteínas recombinantes ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), confrontados com soro pré-imune de camundongos inoculados com a bacterina.

4.6 Análise estatística

A avaliação das diferenças estatísticas utilizando o Teste T Student com nível de significância $P < 0,05$, demonstrou que sete das oito lipoproteínas avaliadas induziram uma resposta imune humoral específica significativa nos camundongos, em relação aos animais do grupo controle negativo salina/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ e ao dia pré-imune dos animais vacinados. A exceção foi a LIC13305r, que não demonstrou uma resposta significativa estatisticamente.

Quanto à avaliação da reatividade do soro imune de *L. interrogans* com as proteínas recombinantes, todas as oito lipoproteínas testadas apresentaram diferença estatística quando comparadas ao controle negativo, onde a placa foi sensibilizada com o *pool* proteínas recombinantes ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Já para o outro controle negativo utilizado nesta avaliação, onde a placa foi sensibilizada com a bacterina ($5 \times 10^7 \text{ cél.mL}^{-1}$), uma única proteína (LIC10009r) não apresentou diferença estatística significativa ($P > 0,05$) em relação à este grupo.

4.7 Reconhecimento das proteínas pelo soro de pacientes com leptospirose

As proteínas recombinantes dialisadas foram avaliadas quanto à reatividade com *pool* de soro de pacientes com diagnóstico de leptospirose. Utilizou-se como controle positivo a proteína recombinante LipL32, por ser uma proteína comprovadamente antigênica e altamente conservada entre diferentes sorovares. Das oito proteínas testadas neste estudo, seis foram reconhecidas pelo soro convalescente de pacientes com leptospirose (Figura 8 painel A). Nesta avaliação, as lipoproteínas LIC10054r e LIC10009r, não apresentaram uma reação tão evidenciada quanto as demais (Figura 8 painel A, coluna 3 e 8).

As oito proteínas recombinantes foram também testadas contra um *pool* de soro humano sem títulos de anticorpos contra leptospira. Na figura 8 (painel B) pode ser visualizado o resultado desta avaliação. Duas proteínas (LIC20172r e LIC13305r), que tinham sido reconhecidas pelo soro com títulos de anticorpos para leptospirose, também apresentaram reação com o soro negativo, indicando a presença de anticorpos contra estas proteínas. Para comprovar que as proteínas não estavam reagindo de forma inespecífica com o anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Calbiochem), elas foram submetidas a um *Western blotting* nas mesmas condições dos demais, utilizando somente o anticorpo secundário. Nesta avaliação, nenhuma das oito proteínas recombinantes apresentou reação com o anticorpo conjugado anti-IgG (dados não mostrados). Na figura 8 (painel C) pode ser visualizado uma réplica do SDS-PAGE utilizado para a realização dos *Western blotting*.

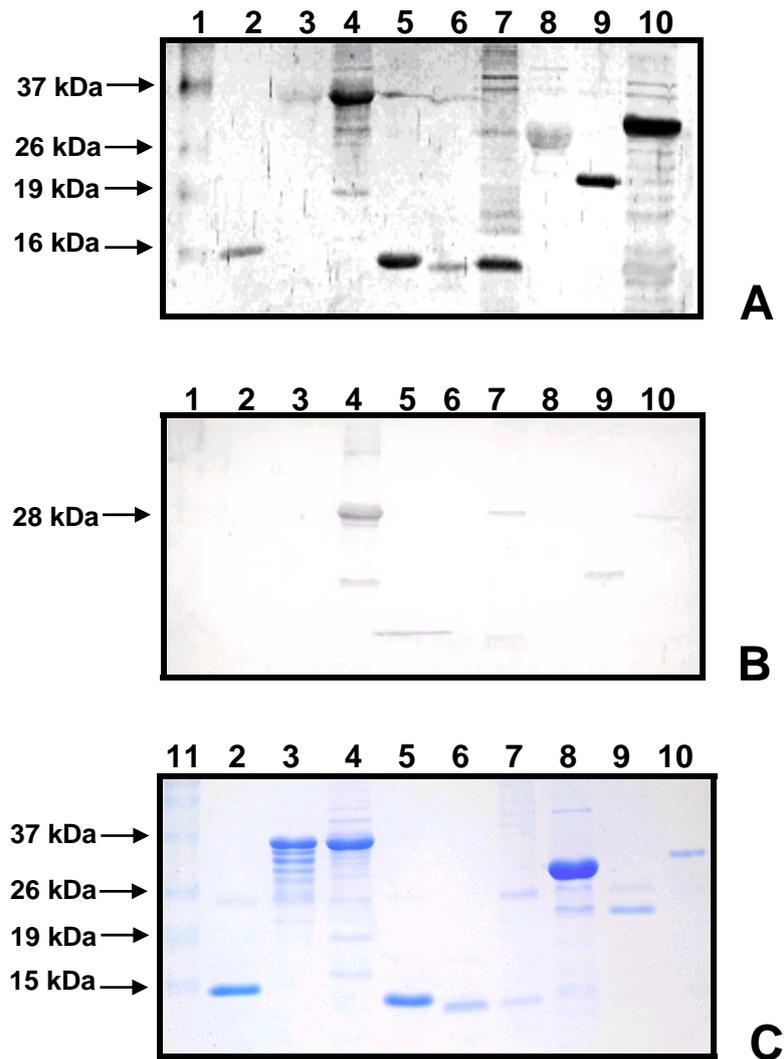


Figura 8: Antigenicidade das proteínas recombinantes de *L. interrogans*. Painel A: *Western blotting* com *pool* do soro de pacientes com diagnóstico de leptospirose na fase convalescente (diluição 1:100). Painel B: *Western blotting* com *pool* de soro humano sem títulos para leptospirose. Painel C: SDS-PAGE 15% corado com *Comassie Blue*. Anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase foi utilizado como anticorpo secundário na diluição de 1:500. As bandas foram reveladas com DAB/H₂O₂. Coluna 1, Marcador SeeBlue® Plus Pre-Stained Standard 1x; coluna 2, LIC11058r (17,3 kDa); coluna 3, LIC10054r (32,1 kDa); coluna 4, LIC20172r (28,1 kDa); coluna 5, LIC13059r (14,4 kDa); coluna 6, LIC11567r (13,9 kDa); coluna 7, LIC10091r (14,6 kDa); coluna 8, LIC10009r (24,8 kDa); coluna 9, LIC13305r (20,3 kDa); coluna 10, controle positivo LipL32r (32 kDa) e Coluna 11, Marcador SeeBlue® Plus Pre-Stained Standard 1x.

5 DISCUSSÃO

A superfície celular bacteriana constitui o sítio das interações com os tecidos do hospedeiro durante o curso da infecção. Comprovadamente, há expressão de uma série de proteínas de membrana, quando o patógeno interage com o hospedeiro, o que estimula o sistema imune.

Para *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni, objeto deste estudo, a identificação de determinantes de virulência expressos durante a infecção, são alvos de intensiva investigação no campo da patogênese deste microrganismo (SHANG; SUMMERS; HAAKE, 1996; HAAKE et al., 2000; MATSUNAGA et al., 2002; CULLEN et al., 2003). O foco da nossa pesquisa foi, portanto, identificar *in silico* proteínas potenciais e testá-las quanto ao seu potencial imunoprotetor no desenvolvimento da vacina recombinante contra leptospirose e para uso em testes diagnósticos.

A era pós-genoma de *Leptospira* tem possibilitado caracterizar novos alvos para desenvolvimento da vacina e uso em testes diagnósticos. Até ser completado o seqüenciamento do genoma de *Leptospira*, somente cerca de oito lipoproteínas associadas à OM deste patógeno tinham sido identificadas por isolamento de frações da membrana, como as proteínas LipL32 e LipL41 (SHANG; SUMMERS; HAAKE, 1996; HAAKE et al., 2000).

Com o advento da tecnologia recombinante e uso de uma estratégia revolucionária no campo de desenvolvimento de vacinas, que utiliza a análise *in silico* de potenciais alvos, Gamberini e colaboradores (2005), conseguiram clonar e expressar em *E. coli*, mais de 174 novas proteínas de *Leptospira*, das quais 16 foram identificadas como candidatas potenciais à vacina. Similarmente, Maione et al. (2005), clonaram e testaram 312 proteínas do grupo B de *Streptococcus* e, deste total, quatro demonstraram proteção em ratos.

O programa PSORT nos permitiu selecionar proteínas que apresentaram um escore mais alto, indicando que estas estavam associadas à OM do organismo em estudo. Optou-se por proteínas com esta localização devido à literatura, que aponta estes alvos como potenciais vacinógenos (SHANG; SUMMERS; HAAKE, 1996; HAAKE et al., 1999; BRANGER et al., 2001; CULLEN et al., 2002; MATSUNAGA et al., 2003; NATARAJASEENIVASAN et al., 2004; CULLEN et al., 2005; KOIDE et al., 2005; ZHANG et al., 2005), devido, principalmente, a presença de anticorpos contra

OMPs no soro de pacientes contaminados (GUERREIRO et al., 2001; KOIZUMI; WATANABE, 2005). Na avaliação da capacidade imunogênica de OMPs de *Leptospira*, um importante aspecto é sua associação com a membrana da bactéria (HAAKE et al., 1999). Com base nestas avaliações, foram selecionadas oito lipoproteínas associadas a OM de *Leptospira*.

De acordo com os critérios de identificação previamente descritos por Haake (2000) e Nascimento et al. (2004a), seis das proteínas avaliadas (LIC20172r, LIC13059r, LIC11567r, LIC10091r, LIC10009r e LIC13305r), são prováveis novas lipoproteínas. As demais (LIC11058r e LIC10054r) apresentaram similariedade com proteínas já descritas previamente em outras bactérias, através dos mesmos critérios de avaliação acima referidos. De acordo com o banco de dados GenBank a proteína LIC11058r é identificada como membro da família LemA, pois contém uma hélice transmembrana na região N-terminal da proteína. Foi predito que uma pequena porção desta região N-terminal é extracelular. A função molecular exata desta proteína ainda é incerta. A proteína LIC10054 apresentou homologia com uma lipoproteína A rara (RlpA) de outros microrganismos (de acordo com dados depositados no GenBank), possuindo uma região conservada dobrada DPBB (*double-psi beta barrel*). A função desta lipoproteína ainda não é bem compreendida, mas sabe-se que esta dobra DPBB é, freqüentemente, um domínio enzimático. Os membros desta família são bastante diversos, podendo conter várias funções diferentes.

A presença de regiões transmembrana foi evidenciada nas oito lipoproteínas. O número de aminoácidos transmembrana variou entre as proteínas, indo de 2 a 20, geralmente dispostos na região N-terminal, o que indica, supostamente, a região de ancoramento no espaço extracelular ou periplasmático da OM da *Leptospira* (ZUERNER et al., 2000).

Embora o genoma de *L. interrogans* seja rico em AT, em comparação ao conteúdo GC (35%) (NASCIMENTO et al., 2004a), o que de certa forma dificulta o desenho de primers e amplificação dos genes, foi possível amplificar e clonar os oito genes alvos, bem como expressar e purificar as proteínas recombinantes em *E. coli*. Todas as proteínas recombinantes foram encontradas no *pellet* das culturas lisadas (insolúveis), formando durante sua expressão, corpúsculos de inclusão. Segundo Georgiou e Segatori (2005) é difícil expressar proteínas insolúveis para o meio e obtê-las na forma solúvel e ativa, pois, freqüentemente, a super-expressão conduz à

produção destes corpúsculos, que são agregados insolúveis de proteínas. No entanto, o protocolo de solubilização adotado por Gamberini et al. (2005), que utiliza uréia para solubilizar lipoproteínas de *Leptospira*, é eficiente, o que também pôde ser comprovado em nosso estudo, pois todas as proteínas alvos puderam ser purificadas desta forma.

As proteínas recombinantes foram avaliadas no presente estudo, quando à seu potencial indutor de uma resposta imune humoral específica em camundongos, sendo a quantidade de anticorpos produzidos por estes animais estimada através de ELISA. Hakee et al. (1999), testaram a resposta de anticorpos em hamsters, inoculados com 50 µg das OMPs LipL41 e OmpL1 recombinantes. A resposta medida em leitor de ELISA demonstrou uma OD₄₅₀ de 0,9 para ambas as proteínas, em comparação ao controle negativo (OD₄₅₀ de 0,2). Na avaliação de uma vacina contra *L. interrogans*, Branger et al. (2001), administraram o antígeno Hap1 (LipL32) recombinante via intramuscular, obtendo uma OD de anticorpos de mais de 1.0. Em nossa avaliação, obtivemos níveis de resposta variável induzida pelas proteínas. A que apresentou um maior potencial imunogênico foi a LIC10009r, com uma OD₄₅₀ máxima de 0,7. As demais LICs oscilaram entre 0,3 e 0,4 de absorvância, sendo a LIC13305r a que apresentou a menor absorvância, não excedendo 0,1. Esta lipoproteína foi a única que não apresentou uma resposta imune humoral diferente estatisticamente da apresentada pelo grupo controle negativo salina/Al(OH)₃. Nos animais controles negativos, inoculados com salina e o adjuvante hidróxido de alumínio, não foi observada a presença de anticorpos específicos. Optou-se por utilizar este adjuvante nas vacinas, pois sua administração em humanos e animais é permitida. O hidróxido de alumínio já foi testado com adjuvante por outros autores, na administração de vacinas de subunidade recombinantes (HAAKE et al., 1999; BROWN et al., 2003).

Através da técnica de *Western blotting*, podemos confrontar as proteínas recombinantes com o soro imune de pacientes com diagnóstico de leptopirose. Neste teste, seis proteínas foram detectadas como potenciais candidatas à vacina e para uso em testes diagnósticos. As proteínas LIC10054r e LIC10091r tiveram sua imunoreatividade com soro de pacientes com leptopirose confirmada por outros autores (GAMBERINI et al., 2005). Na avaliação realizada em nosso estudo, a proteína LIC10091r confirmou o resultado obtido por estes autores, no entanto, a LIC10054r, sob as condições em que realizamos o teste, não teve reação

evidenciada com o soro positivo. Talvez, isto seja devido ao fato de não termos clonado o gene inteiro, mas a porção mais hidrofílica e antigênica da proteína, identificada através de análise no programa Vector NTI 8.0 (Informax inc.). Considera-se, portanto, que a porção restante da proteína possa conter algum epítipo reconhecido pelo soro. A realização do *Western blotting* com soro humano negativo para leptospirose, revelou reação deste com duas proteínas recombinantes. Acreditamos que isto possa ter ocorrido devido à presença, nestes antígenos, de determinantes antigênicos comuns a outros antígenos que indivíduos sadios tenham tido contato.

Para os testes de reatividade optou-se confrontar as proteínas recombinantes com o soro de pacientes com leptospirose diagnosticada na fase convalescente da doença, pois é nesta fase que ocorre maior produção de anticorpos (MITCHISON et al., 1997; LEVETT, 2001; BAL, 2005), sendo o isotipo IgG predominante (NATARAJASEENIVASAN et al., 2004). Em nosso estudo foi evidenciada a presença de anticorpos IgG contra as proteínas alvos no soro destes pacientes, através do anticorpo secundário conjugado anti-IgG. Em estudos prévios, realizados por Guerreiro et al. (2001), foi comprovado que tanto na fase aguda quanto na convalescente, os anticorpos produzidos contra proteínas são exclusivamente imunoglobulinas G, enquanto para lipopolissacarídeos (LPS) predominam imunoglobulinas M. Nestes testes de reatividade, utilizou-se a proteína LipL32 como controle positivo, por ser um antígeno de membrana externa imunodominante, expresso durante a infecção em humanos, sendo conservado e presente em todos os sorovares patogênicos (HAAKE et al., 2000; GUERREIRO et al., 2001; BRANGER et al., 2001).

Um importante aspecto do soro de pacientes naturalmente infectados por *Leptospira* e que desenvolvem a infecção, é que isto provavelmente seja resultante de pequenas doses do agente infeccioso. Desta forma, a resposta imune desencadeada é exclusivamente contra antígenos expressos pelo microrganismo dentro do hospedeiro durante o curso da infecção e não contra antígenos expressos exclusivamente em modelos animais inoculados (GUERREIRO et al., 2001). Em nosso estudo, além de confrontar as proteínas com soro de pacientes com leptospirose, também avaliamos sua reatividade com o soro imune de camundongos inoculados com a bacterina. Nesta avaliação, os anticorpos produzidos pelos

camundongos contra as proteínas alvos em sua forma nativa, foram capazes de reconhecê-las em sua forma recombinante.

O uso da análise genômica na identificação de novos antígenos vacinais representa vantagens em termos de custo e tempo na construção de vacinas, quando comparada às estratégias convencionais. Oportunamente, Rappuoli (2000) e Serruto et al. (2004), comparam a produção de vacinas utilizando a metodologia convencional e reversa. O tempo em anos dispendido para produção de uma vacina nos moldes de desenvolvimento convencional, com seleção dos antígenos, crescimento do patógeno, purificação e identificação dos componentes, testes com soro convalescente e testes de imunogenicidade, dura de 5 a 15 anos, para só depois poderem ser testadas em modelos animais. Em comparação, a vacinologia reversa, para a análise *in silico* das seqüências, predição computacional de antígenos candidatos à vacina, clonagem e expressão das ORFs selecionadas e testes em modelos animais, leva de 1 a 2 anos.

Levando em consideração a alta imunogenicidade em camundongos, reação positiva com soro de pacientes com leptospirose e negativa com soro de indivíduos saudáveis, foi possível identificar, sob as condições em que realizamos os testes, as LICs 11058r, 13059r, 11567r e 10091r como os antígenos com maior potencial.

Os resultados obtidos em nosso estudo representam uma contribuição importante no campo de desenvolvimento de uma vacina potente e eficaz no controle da leptospirose e também para uso diagnóstico, pois as proteínas aqui descritas demonstraram potencial imunogênico e certamente serão exploradas neste sentido, através da realização de testes de desafio e de caracterização destas proteínas, motivando a continuidade dos estudos.

6 CONCLUSÕES

- Foi possível clonar e expressar em *E. coli* os oito genes alvos selecionados de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130, que codificam lipoproteínas associadas à membrana celular da espiroqueta;
- Sete das oito proteínas purificadas foram capazes de induzir uma resposta imune humoral específica e estatisticamente significativa nos camundongos imunizados, em relação ao grupo controle negativo salina/Al(OH)₃;
- Os anticorpos produzidos pelos camundongos inoculados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (bacterina) contra as proteínas alvos em sua forma nativa, foram capazes de reconhecer proteínas também em sua forma recombinante;
- Seis proteínas foram reconhecidas pelo soro humano com diagnóstico de leptospirose na fase convalescente, confirmando a produção de anticorpos contra estas proteínas no curso da infecção;
- Considerando a imunogenicidade em camundongos e reatividade com soro de pacientes com leptospirose, os antígenos com maior potencial imunoprotetor e que deverão ser avaliados em ensaios de desafio em hamsters são as LICs 11058r, 13059r, 11567r e 10091r.

7 REFERÊNCIAS

- ADA, G.; RAMSHAW, I. DNA vaccination. **Expert Opinion Emerging Drugs**. 8, 27-35, 2003.
- ALAM, M.; HO, S.; VANCE, D. E.; LEHNER, R. Heterologous Expression, Purification, and Characterization of Human Triacylglycerol Hydrolase. **Protein Expression and Purification**. 24, 33-42, 2002.
- ALT, D. P.; ZUERNER, R. L.; BOLIN, C. A. Evaluation of Antibiotics for Treatment of Cattle Infected With *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 219, 636-639, 2001.
- BABIUK, L. A.; BABIUK, S.L.; LOEHR, B. I.; LITTEL-VAN DEN HURK, S. V. Nucleic Acid Vaccines: Research Tool or Commercial Reality. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 76, 1-23, 2000.
- BAL, A. M. Unusual Clinical Manifestations of Leptospirosis. **Journal of Postgraduate Medical**, 51, 179-183, 2005.
- BALAKRISHNAN, P.; RAJENDRAN, P.; SURESH BABU, L. A seroepidemiological study of leptospirosis among high-risk population. **Indian Journal of Medical Microbiological**. 12, 125-129, 1994.
- BARCELLOS, C.; LAMMERHIRT, C. B.; ALMEIDA, M. A. B. de; SANTOS, E. dos. Distribuição Espacial da Leptospirose no Rio Grande do Sul, Brasil: recuperando a ecologia dos estudos ecológicos. **Cadernos de Saúde Pública**. 19, 1283-1292, 2003.
- BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; BOLIN, C. A.; SUMMERS, T. A.; WAGAR, E. A.; CHEVILLE, N. F.; HARTSKEERL, R. A.; HAAKE, D. A. Expression and Distribution of Leptospiral Outer Membrane Components During Renal Infection of Hamsters. **Infection and Immunity**. 67, 853-861, 1999.
- BAROCCHI, M. A.; KO, A. I.; FERRER, S. R.; FARIA, M. T.; REIS, M. G.; RILEY, L. W. Identification of New Repetitive Element in *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni and Its Application to PCR-Based Differentiation of *Leptospira* Serogroups. **Journal of Clinical Microbiology**. 39, 191-195, 2001.
- BHARADWAJ, R. Leptospirosis - a Reemerging Disease? **Indian Journal of Medical Research**. 120, 136-138, 2004.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a Zoonotic Disease of Global Importance. **Lancet Infectious Diseases**. 3, 757-771, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry**. 72, 248-254, 1976.

BRANGER, C.; SONRIER, C.; CHATRENET, B.; KLONJKOWSKI, B.; RUVOEN-CLOUET, N.; AUBERT, A.; ANDRE-FONTAINE, G.; ELOIT, M. Identification of the Hemolysis-Associated Protein 1 As a Cross-Protective Immunogen of *Leptospira interrogans* by Adenovirus-Mediated Vaccination. **Infection and Immunity**. 69, 6831-6838, 2001.

BROCHIER, B.; KIENY, M. P.; COSTY, F.; COPPENS, P.; BAUDUIN, B.; LECOCQ, J. P.; LANGUET, B.; CHAPPUIS, G.; DESMETTRE, P.; AFIADEMANYO, K.; LIBOIS, R.; PASTORET, P. P. Large-Scale Eradication of Rabies Using Recombinant Vaccinia Rabies Vaccine. **Nature**. 354, 520-522, 1991.

BROWN, T. A. **Clonagem Gênica e Análise de DNA**. 4ª ed., Porto Alegre: Artmed, 376 p., 2003.

BROWN, R. A.; BLUMERMAN, S.; GAY, C.; BOLIN, C.; DUBY, R.; BALDWIN, C. L. Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. **Vaccine**. 21, 4448-4458, 2003.

CLARK, T. G.; CASSIDY-HANLEY, D. Recombinant Subunit Vaccines: Potential and Constraints. **Fish Vaccinology**. 121, 153-163, 2005.

CHAMBERLAIN, N. R.; RADOLF, J. D.; HSU, P. L.; SELL, S.; NORGDARD, M. V. Genetic and physicochemical characterization of the recombinant DNA-derived 47-kilodalton surface immunogen of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. **Infection and Immunity**. 56, 71-78, 1988.

CULLEN, P. A.; CORDWELL, S. J.; BULACH, D. M.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Infection and Immunity**. 70, 2311-2318, 2002.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D.A.; BULACH, D. M.; ZUERNER, R.L.; ADLER, B. LipL21 Is a Novel Surface-Exposed Lipoprotein of Pathogenic *Leptospira* Species. **Infection and Immunity**. 71, 2414-2421, 2003.

CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A.I.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* Spp. **Infection and Immunity**. 73, 4853-4863, 2005.

DING, Y.; JIANG, M.; JIANG, W. H.; SU, Y.; ZHOU, H. Q.; HU, X. J.; ZHANG, Z. H. Expression, Purification, and Characterization of Recombinant Human Flotillin-1 in *Escherichia Coli*. **Protein Expression and Purification**. 42, 137-145, 2005.

ELLIS, W. A.; HOVINDHOUGEN, K.; MOLLER, S.; BIRCHANDRESEN, A. Morphological-Changes Upon Subculturing of Freshly Isolated Strains of *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo. **Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene Series A-Medical Microbiology Infectious Diseases Virology Parasitology**. 255, 323-335, 1983.

FAINE, S. A. B. B. C. P. P. *Leptospira and leptospirosis* (2nd edn ed.), 2nd edn ed. ed., 1999.

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. Whole-Genome Analysis of *Leptospira Interrogans* to Identify Potential Vaccine Candidates Against Leptospirosis. **FEMS Microbiological Letters**. 244, 305-313, 2005.

GEORGIU, G.; SEGATORI, L. Preparative Expression of Secreted Proteins in Bacteria: Status Report and Future Prospects. **Current Opinion in Biotechnology**. 16, 538-545, 2005.

GRIFFITH, D. A.; DELIPALA, C.; LEADSHAM, J.; JARVIS, S. M.; OESTERHELT, D. A Novel Yeast Expression System for the Overproduction of Quality-Controlled Membrane Proteins. **Febs Letters**. 553, 45-50, 2003.

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; GALVAO, R. M.; LEVETT, P. N.; KO, A.I.; HAAKE, D. A. Leptospiral Proteins Recognized During the Humoral Immune Response to Leptospirosis in Humans. **Infection and Immunity**. 69, 4958-4968, 2001.

HAAKE, D. A.; MARTINICH, C.; SUMMERS, T. A.; SHANG, E. S.; PRUETZ, J. D.; MCCOY, A. M.; MAZEL, M. K.; BOLIN, C. A. Characterization of Leptospiral Outer Membrane Lipoprotein LipL36: Downregulation Associated With Late-Log-Phase Growth and Mammalian Infection. **Infection and Immunity**. 66, 1579-1587, 1998.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41 Exhibit Synergistic Immunoprotection. **Infection and Immunity**. 67, 6572-6582, 1999.

HAAKE, D. A. Spirochaetal Lipoproteins and Pathogenesis. **Microbiology-Uk**. 146, 1491-1504, 2000.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed During Mammalian Infection. **Infection and Immunity**. 68, 2276-2285, 2000.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the Leptospiral Outer Membrane and Description of Three Novel Leptospiral Membrane Proteins. **Infection and Immunity**. 70, 4936-4945, 2002.

HAUK, P.; NEGROTTO, S.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; GENOVEZ, M. E.; WARD, R. J.; SCHATNER, M.; GOMEZ, R. M.; HO, P. L. Expression and Characterization of HlyX Hemolysin From *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni: Potentiation of Hemolytic Activity by LipL32. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 333, 1341-1347, 2005.

HAYASHI, S.; WU, H. C. Lipoproteins in bacteria. **Journal of Bioenergetic and Biomembres**. 22, 451-471, 1990.

- HOCKNEY, R. C. Recent Developments in Heterologous Protein-Production in *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**. 12, 456-463, 1994.
- HOUPIKIAN, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; BROUQUI, P. Leptospiroses. **Maladies Infectieuses**. 8-039-Q-10, 14 p., 2002.
- HOWARTH, M.; ELLIOTT, T. The processing of antigens delivered as DNA vaccines. **Immunological Reviews**. 199, 27-39, 2001.
- HOWE, T. R.; MAYER, L. W.; BARBOUR, A. G. A single recombinant plasmid expressing two major outer surface proteins of the Lyme disease spirochete. **Science**. 227, 645-646, 1985.
- IKOEV, V. N.; GORBUNOV, M. A.; VACHAEV, B. F.; IAGOVKIN, E. A.; KONDRATENKO, V. F.; ANAN'INA, I.; ANSIMOVA, T. I.; KOSTINA, N. I.; IUR'eva, I. L.; NIKITIN, M. G. The evaluation of the reactogenicity and immunogenic activity of a new concentrated inactivated leptospirosis vaccine. **Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunobiologii**. 39-43, 1999.
- JIANG, X Y.; WANG, C. F.; WANG, C. F.; ZHANG, P. J.; HE, Z. Y. Cloning and Expression of *Mycobacterium bovis* Secreted Protein MPB83 in *Escherichia coli*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. 39, 22-25, 2006.
- JIMENEZ-DELGADILLO, B.; CHAUDHURI, P. P.; BAYLON-PACHECO, L.; LOPEZ-MONTEON, A.; TALAMAS-ROHANA, P.; ROSALES-ENCINA, J. L. *Entamoeba histolytica*: CDNAs Cloned As 30kDa Collagen-Binding Proteins (CBP) Belong to an Antioxidant Molecule Family. Protection of Hamsters From Amoebic Liver Abscess by Immunization With Recombinant CBP. **Experimental Parasitology**. 108, 7-17, 2004.
- JOUGLARD, S. D.; MEDEIROS, M. A.; VAZ, E. K.; BASTOS, R. G.; CUNHA, C. W.; ARMOA, G. R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. An Ultra-Rapid and Inexpensive Plasmid Preparation Method for Screening Recombinant Colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**. H 71, 234, 2002.
- JUNCKER, A. S.; WILLENBROCK, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S.; NIELSEN, H.; KROGH, A. Prediction of Lipoprotein Signal Peptides in Gram-Negative Bacteria. **Protein Science**. 12, 1652-1662, 2003.
- KO, AI; REIS, M. G.; DOURADO, C. M. R.; JOHNSON, W. D.; RILEY, L. W. Urban Epidemic of Severe Leptospirosis in Brazil. **Lancet**. 354, 820-825, 1999.
- KOIDE, S.; YANG, X. H.; HUANG, X. L.; DUNN, J. J.; LUFT, B. J. Structure-Based Design of a Second-Generation Lyme Disease Vaccine Based on a C-Terminal Fragment of *Borrelia burgdorferi* OspA. **Journal of Molecular Biology**. 350, 290-299, 2005.
- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis Vaccines: Past, Present, and Future. **Journal of Postgraduate Medical**. 51, 210-214, 2005.
- KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia Genética e Biotecnologia**. 2^a ed., Porto Alegre: Artmed, 434 p., 2002.

KUMAGAI, T.; KUDO, Y.; FUKUCHI, Y.; EBINA, K.; YOKOTA, K. Expression of a Synthetic Gene Encoding the Asp-Hemolysin From *Aspergillus fumigatus* in *Escherichia coli*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. 25, 115-117, 2002.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiological Review**. 14, 296-326, 2001.

LACK, G.; HOMBERGER-ZIZZARI, E.; FOLKERS, G.; SCAPOZZA, L.; PEROZZO, R. Recombinant expression and biochemical characterization of the unique elongating beta -ketoacyl-ACP synthase involved in fatty acid biosynthesis of *Plasmodium falciparum* using natural and artificial substrates. **Journal of Biological and Chemistry**. 1-21, 2006.

LOMAR, A. V.; DIAMENT, D.; TORRES, J. R. Leptospirosis in Latin America. **Infectious Disease Clinics of North America**. 14, 23-+, 2000.

MACKETT, M.; SMITH, G. L.; MOSS, B. Vaccinia Virus: a Selectable Eukaryotic Cloning and Expression Vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 79, 7415-7519, 1982.

MADAM, B.; SANKARAN, K. DOLOP – database of bacterial lipoproteins. **Bioinformatics**. 18, 641-643, 2002.

MAIONE, D.; MARGARIT, I.; RINAUDO, C. D.; MASIGNANI, V.; MORA, M.; SCARSELLI, M.; TETTELIN, H.; BRETTONI, C.; IACOBINI, E. T.; ROSINI, R.; D'AGOSTINO, N.; MIORIN, L.; BUCCATO, S.; MARIANI, M.; GALLI, G.; NOGAROTTO, R.; DEI, V. N.; VEGNI, F.; FRASER, C.; MANCUSO, G.; TETI, G.; MADOFF, L. C.; PAOLETTI, L. C.; RAPPUOLI, R.; KASPER, D. L.; TELFORD, J. L.; GRANDI, G. Identification of a Universal Group B *Streptococcus* Vaccine by Multiple Genome Screen. **Science**. 309, 148-150, 2005.

MAKRIDES, S. C. Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**. 60, 512-&., 1996.

MAO, Y. F.; YAN, J.; LI, L. W.; LI, S. P. Construction of HpaA Gene From a Clinical Isolate of *Helicobacter pylori* and Identification of Fusion Protein. **World Journal of Gastroenterology**. 9, 1529-1536, 2003.

MARTINEZ, S. R.; PEREZ, S. A.; BARO, S. M.; ALVAREZ, A. M.; MENENDEZ, H. J.; DIAZ, G. M.; CRUZ, D. L. P.; DE LOS, R. G.; MONTOYA, B. B.; SIERRA, G. G.; ARMESTO, D. R.; SALTAREN, C. A.; SABOURNIN, R. O. Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis in groups at risk. **Revista Panamericana Salud Publica**. 8, 385-392, 2000.

MARTINEZ, R.; PEREZ, A.; QUINONES, M. C.; CRUZ, R.; ALVAREZ, A.; ARMESTO, M.; FERNANDEZ, C.; MENENDEZ, J.; RODRIGUEZ, I.; BARO, M.; DIAZ, M.; RODRIGUEZ, J.; SIERRA, G.; OBREGON, A. M.; TOLEDO, M. E.; FERNANDEZ, N. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. **Revista Panamericana Salud Publica**. 15, 249-255, 2004.

MASI, M.; PAGES, J. M.; PRADEL, E. Overexpression and Purification of the Three Components of the *Enterobacter aerogenes* AcrA-AcrB-TolC Multidrug Efflux Pump.

Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 786, 197-205, 2003.

MATSUNAGA, J.; YOUNG, T. A.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; BOLIN, C. A.; HAAKE, D. A. Novel 45-Kilodalton Leptospiral Protein That Is Processed to a 31-Kilodalton Growth-Phase-Regulated Peripheral Membrane Protein. **Infection and Immunity.** 70, 323-334, 2002.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; ALBERT, K. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology.** 49, 929-945, 2003.

MCARTHUR, J.; SCHULZE, K.; CHIN, J.; CURRIE, B. J.; SRIPRAKASH, K. S.; TALAY, S. R.; CHHATWAL, G. S.; GUZMAN, C. A.; WALKER, M. J. Immune Responses of a Liposome/ISCOM Vaccine Adjuvant Against Streptococcal Fibronectin Binding Protein 1 (Sfb1) in Mice. **Indian Journal of Medical Research.** 119, 115-120, 2004.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion Infectious Disease.** 18, 376-386, 2005.

MCSHANE, H.; PATHAN, A. A.; SANDER, C. R.; KEATING, S. M.; GILBERT, S. C.; HUYGEN, K.; FLETCHER, H. A.; HILL, A. V. S. Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing Antigen 85A Boosts BCG-Primed and Naturally Acquired Antimycobacterial Immunity in Humans. **Nature Medicine.** 10, 1240-1244, 2004.

MICHELINI, Z.; NEGRI, D. R. M.; BARONCELLI, S.; CATONE, S.; COMINI, A.; MAGGIORELLA, M. T.; SERNICOLA, L.; CROSTAROSA, F.; BELLI, R.; MANCINI, M. G.; FARCOMENI, S.; FAGROUCH, Z.; CICOZZI, M.; ROVETTO, C.; LILJESTROM, P.; NORLEY, S.; HEENEY, J.; TITTI, F. T-cell-mediated protective efficacy of a systemic vaccine approach in cynomolgus monkeys after SIV mucosal challenge. **Journal of Medical Primatology.** 33, 251-261, 2004.

MITCHISON, M.; BULACH, D. M.; VINH, T.; RAJAKUMAR, K.; FAINE, S.; ADLER, B. Identification and Characterization of the DTDP-Rhamnose Biosynthesis and Transfer Genes of the Lipopolysaccharide-Related Rfb Locus in *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. **Journal of Bacteriology.** 179, 1262-1267, 1997.

MURHEKAR, M. V.; SUGUNAN, A. P.; VIJAYACHARI, P.; SHARMA, S.; SEHGAL, S. C. Risk Factors in the Transmission of Leptospiral Infection. **Indian Journal of Medical Research.** 107, 218-223, 1998.

NASCIMENTO, A. L. T. O.; KO, A. I.; MARTINS, E. A. L.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F. M.; LEITE, L. C. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL DORRY, H.; FERRO, E. S.; FERRO, M. I. T.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GOES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S.; HARAKAVA, R.; JERONIMO, S. M. B.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; DE OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; REIS, M. S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA,

W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J. G.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E. A.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. **Journal of Bacteriology**. 186, 2164-2172, 2004a.

NASCIMENTO, A. L. T. O.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E. A.; DIGIAMPIETRI, L. A.; HARSTKEERL, R. A.; HO, P. L.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; HAAKE, D. A.; MARTINS, E. A. L. Genome Features of *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 37, 459-478, 2004b.

NATARAJASEENIVASAN, K.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHARMA, S.; SEHGAL, S. C. Leptospiral proteins expressed during acute & convalescent phases of human leptospirosis. **Indian Journal of Medical Research**. 120, 151-159, 2004.

NORRIS, S. J. Polypeptides of *Treponema pallidum* : progress toward understanding their structural, functional and immunologic roles. *Treponema pallidum* Polypeptide Research Group. **Microbiology Review**. 57, 750-779, 1993.

PAETZEL, M.; DALBEY, R. E.; STRYNADKA, N. C. J. Crystal Structure of a Bacterial Signal Peptidase Apoenzyme - Implications for Signal Peptide Binding and the Ser-Lys Dyad Mechanism. **Journal of Biological Chemistry**. 277, 9512-9519, 2002.

PAOLAZZI, C. C.; PEREZ, O.; DE FILIPPO, J. Rabies Vaccine - Developments Employing Molecular Biology Methods. **Molecular Biotechnology**. 11, 137-147, 1999.

PENA-MOCTEZUMA, A.; BULACH, D. M.; KALAMBAHETI, T.; ADLER, B. Comparative Analysis of the LPS Biosynthetic Loci of the Genetic Subtypes of Serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* Subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* Subtype Hardjobovis. **Fems Microbiology Letters**. 177, 319-326, 1999.

PETERSEN, A. M.; BOYE, K.; BLOM, J.; SCHLICHTING, P.; KROGFELT, K. A. First Isolation of *Leptospira fainei* Serovar Hurstbridge From Two Human Patients With Weil's Syndrome. **Journal of Medical Microbiology**. 50, 96-100, 2001.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis of *Leptospira* Spp. in Humans. **Microbes and Infection**. 2, 1265-1276, 2000.

RAMADAS, P.; JARVIS, B. D. W.; CORNER, R. J.; PENNY, D.; MARSHALL, R. B. Genetic-Characterization of Pathogenic *Leptospira* Species by Dna Hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 42, 215-219, 1992.

RAPPUOLI, R. Reverse Vaccinology. **Current Opinion in Microbiology**. 3, 445-450, 2000.

RAPPUOLI, R.; COVACCI, A. Reverse Vaccinology and Genomics. **Science**. 302, 602, 2003.

RATNAM, S.; EVERARD, C. O. R.; ALEX, J. C.; SURESH, B.; THANGARAJU, P. Prevalence of Leptospiral Agglutinins Among Conservancy Workers in Madras City, India. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 96, 41-45, 1993.

REN, S. X.; GANG, F.; JIANG, X. G.; ZENG, R.; MIAO, Y. G.; XU, H.; ZHANG, Y. X.; XIONG, H.; LU, G.; LU, L. F.; JIANG, H. Q.; JIA, J.; TU, Y. F.; JIANG, J. X.; GU, W. Y.; ZHANG, Y. Q.; CAI, Z.; SHENG, H. H.; YIN, H. F.; ZHANG, Y.; ZHU, G. F.; WAN, M.; HUANG, H. L.; QIAN, Z.; WANG, S. Y.; MA, W.; YAO, Z. J.; SHEN, Y.; QIANG, B. Q.; XIA, Q. C.; GUO, X. K.; DANCHIN, A.; SAINT GIRONS, I.; SOMERVILLE, R. L.; WEN, Y. M.; SHI, M. H.; CHEN, Z.; XU, J. G.; ZHAO, G. P. Unique Physiological and Pathogenic Features of *Leptospira interrogans* Revealed by Whole-Genome Sequencing. **Nature**. 422, 888-893, 2003.

SAMBASIVA, R. R.; NAVEEN, G.; BHALLA, P.; AGARWAL, S. K. Leptospirosis in India and the Rest of the World. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 7, 178-193, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning – A laboratory Manual**. ed. Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SANKARAN, K.; WU, H. C. Lipid Modification of Bacterial Prolipoprotein - Transfer of Diacylglycerol Moiety From Phosphatidylglycerol. **Journal of Biological Chemistry**. 269, 19701-19706, 1994.

SEHGAL, S. C.; MURHEKAR, M. V.; SUGUNAN, A. P. Outbreak of Leptospirosis With Pulmonary Involvement in North-Andaman. **Indian Journal of Medical Research**. 102, 9-12, 1995.

SERRUTO, D.; ADU-BOBIE, J.; CAPECCHI, B.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M.; MASIGNANI, V. Biotechnology and Vaccines: Application of Functional Genomics to *Neisseria meningitidis* and Other Bacterial Pathogens. **Journal of Biotechnology**. 113, 15-32, 2004.

SETUBAL, J. C.; REIS, M.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Lipoprotein Computational Prediction in Spirochaetal Genomes 10.1099/Mic.0.28317-0. **Microbiology-Sgm**. 152, 113-121, 2006.

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. **Infection and Immunity**. 64, 2322-2330, 1996.

SILVA, C.L. Vacinas Gênicas. O impacto sobre o controle das doenças infecciosas. **Biociência Ciência & Desenvolvimento**. 3, 32-34, 1997.

SWARTZ, J. R. Advances in *Escherichia Coli* Production of Therapeutic Proteins. **Current Opinion in Biotechnology**. 12, 195-201, 2001.

VASCONSELLOS, S. A.; ARSKY, M. L.; PEREIRA, J. J.; CASCARDO, E. **Leptospirose: Guia de Vigilância Epidemiológica**, 3^o ed ed. Brasília, 1994.

VERDONCK, F.; COX, E.; VAN DER STEDE, Y.; GODDEERIS, B. M. Oral Immunization of Piglets With Recombinant F4 Fimbrial Adhesin FaeG Monomers

Induces a Mucosal and Systemic F4-Specific Immune Response. **Vaccine**. 22, 4291-4299, 2004.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**. 14, 527-538, 2001.

VINH, T.; ADLER, B.; FAINE, S. Ultrastructure and Chemical-Composition of Lipopolysaccharide Extracted From *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. **Journal of General Microbiology**. 132, 103-109, 1986.

WEICKERT, M. J.; DOHERTY, D. H.; BEST, E. A.; OLINS, P. O. Optimization of Heterologous Protein Production in *Escherichia Coli*. **Current Opinion in Biotechnology**. 7, 494-499, 1996.

WHITTON, J. L.; RODRIGUEZ, F.; ZHANG, J.; HASSETT, D. E. DNA Immunization: Mechanistic Studies. **Vaccine**. 17, 1612-1619, 1999.

ZHANG,X.Y.; YU,Y.; HE,P.; ZHANG,Y.X.; HU,B.Y.; YANG,Y.; NIE,Y.X.; JIANG,X.G.; ZHAO,G.P.; GUO,X.K. Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospires. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**. 37, 649-656, 2005.

ZHUO, J. T.; WANG, S. S.; LAN, W. L. A discussion on setting up target age group for immunization against leptospirosis. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**. 24, 33-42, 1995.

ZUERNER, R.; HAAKE, D.; ADLER, B.; SEGERS, R. Technological Advances in the Molecular Biology of *Leptospira*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. 2, 455-462, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)