UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

FABIANA LAURETTI FERREIRA

Identificação e avaliação de novas adesinas em *Leptospira interrogans* por *shotgun phage display*

Versão original da Dissertação defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

14/09/2015

FABIANA LAURETTI FERREIRA

Identificação e avaliação de novas adesinas em *Leptospira interrogans* por *shotgun phage display*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Paulo Lee Ho

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Ferreira, Fabiana Lauretti
F383i Identificação e avaliação de novas adesinas em *Leptospira interrogans por shotgun phage display* / Fabiana Ferreira Lauretti. -- São Paulo, 2015.
180p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Ho, Paulo Lee

1. Genoma : Biologia molecular 2. Microbiologia I. T. II. Ho, Paulo Lee, orientador.

574.88 CDD

Aos meus queridos pais e irmã, Reinaldo, Walquiria e Julianne,
por todo amor, carinho, dedicação e apoio incondicional.
Vocês são a luz do meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Paulo Lee Ho, pela oportunidade de trabalhar no Instituto Butantan, pela confiança depositada no meu trabalho e por todo o conhecimento compartilhado, sempre me mantendo motivada ao longo desses dois anos de Mestrado.

Agradeço também ao Dr. Ricardo Giordano pelo envolvimento e auxílio essenciais para o desenvolvimento do meu projeto e pelo espaço cedido em seu laboratório. Em especial, agradeço ao seu aluno de Doutorado, André Teixeira, pela amizade, pelo trabalho em conjunto e por todas as discussões valiosas que ajudaram no andamento do meu Mestrado.

Agradeço especialmente à doutora Ana por estar presente sempre que possível e por compartilhar sua experiência no projeto. Sua ajuda foi essencial para a realização do meu trabalho.

A todos os membros do laboratório de Biotecnologia Molecular I, principalmente os pesquisadores Eliane, Léo, Jô, Enéas e Alessandra, por sempre estarem dispostos a me ajudar e me acompanhar em diversos momentos do meu trabalho. Muito obrigada por todo aprendizado e apoio.

Às minhas queridas amigas e doutoras Luciane, Juliana e Cláudia por compartilhar suas experiências profissionais e pessoais, por me salvarem dos meus sufocos aparentemente sem solução e pela amizade dentro e fora do laboratório, que rendeu não só momentos tão bons e divertidos, como também reflexões sobre o meu futuro profissional.

Às amigas e também mestrandas Marcela, Rafaella, Júlia e Rúbia pela amizade e compreensão, pelas conversas sérias e descontraídas, pelo apoio nos desabafos e nos resultados positivos e negativos, e pela companhia mesmo durante alguns experimentos noturnos.

Às técnicas do laboratório, Aline, Nidia e Vera, por tornar o meu trabalho possível e mais simples. Agradeço por me ajudar a encontrar tudo no laboratório por tantas vezes e pelos momentos de descontração. Em especial, agradeço à Aline pelas inúmeras amostras para sequenciamento de última hora.

Também deixo meu agradecimento às técnicas Marisa e Rosa do Biotério do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan e aos membros dos laboratórios de Biotecnologia Molecular II, III e IV por concederem o uso de equipamentos complementares.

Agradeço especialmente à pesquisadora Ligia Morganti e sua equipe pela importante colaboração na fase final do projeto.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química, por todo auxílio e contribuição para o meu conhecimento de Bioquímica e Biologia Molecular.

A todos os colegas e queridos amigos do IQ que conheci durante a pós-graduação e que tiveram papel fundamental nessa fase tão especial da minha vida: Carlos, Amanda, Ana Maria, Fabiana e Cícero.

Às instituições que me forneceram suporte financeiro: à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa na maior parte do meu curso de Mestrado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das primeiras bolsas, e à Fundação Butantan.

E, acima de tudo, agradeço a Deus por sempre estar presente na minha vida, e a Nossa Senhora e aos amigos de luz pelo acompanhamento e proteção na minha caminhada. Agradeço aos meus pais, Reinaldo e Walquiria, por todo amor incondicional, carinho, apoio, incentivo, cuidado, paciência e tudo o que vocês fazem e fizeram por mim que possibilitou eu chegar até aqui. Essa conquista também é de vocês! Agradeço também ao apoio e carinho dos meus familiares, em especial minha irmã Julianne e minha vó Irene.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existência. Não se pode deixar de ficar admirado quando se contempla os mistérios da eternidade, da vida, da maravilhosa estrutura da realidade. Basta que se busque compreender um pouco desse mistério a cada dia. Nunca perca a curiosidade… Não pare de se maravilhar.”

Albert Einstein

RESUMO

Ferreira, F.L. **Identificação e avaliação de novas adesinas em *Leptospira interrogans* por *shotgun phage display***. 2015. 180p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Leptospirose é uma doença infecciosa emergente cujos agentes etiológicos são espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. Leptospiras patogênicas possuem inúmeros genes específicos codificando proteínas com funções desconhecidas, sugerindo que as leptospiras apresentam fatores de virulência únicos. Adesinas bacterianas são importantes fatores de virulência e, assim, a identificação de adesinas conservadas em espécies patogênicas de *Leptospira* pela construção de bibliotecas genômicas expostas na superfície de bacteriófagos (*shotgun phage display*), seguida por seleção em células e/ou componentes da matriz extracelular (*biopanning*), pode revelar novos antígenos e alvos para o tratamento e prevenção da leptospirose. Bibliotecas foram construídas com o DNA genômico de *L. interrogans* fragmentado e o fagomídeo pG8SAET, sendo testadas algumas abordagens para clonagem como a ligação entre extremidades cegas (*blunt-end*) e técnicas baseadas em ligação entre extremidades coesivas, incluindo a obtenção de ORESTES e a utilização de adaptadores em grampo. Apesar de serem encontradas algumas limitações, a clonagem por ligação *blunt-end* se mostrou a mais eficiente para a construção de bibliotecas, sendo adotada para a construção de três bibliotecas em maior escala. A seleção de novas possíveis adesinas a partir das bibliotecas construídas foi realizada em células eucarióticas através da metodologia BRASIL. A primeira biblioteca (BBT1) exibiu 10^6 clones totais, a partir da qual foram selecionados quatro proteínas em fase apenas com a proteína VIII do fago (pVIII). No entanto, nenhuma delas seria exposta por programas de predição na bactéria. Outras duas bibliotecas foram

construídas (BBT2 e BBT3), as quais obtiveram um número ideal de clones para uma ampla cobertura do genoma (>$2x10^7$ clones). Por apresentar maior proporção de clones válidos, a BBT2 foi utilizada para a seleção de adesinas, resultando em onze clones em fase com pVIII e/ou sequência sinal do fago. Análises por programas de predição revelaram três proteínas hipotéticas, denominadas LepA962, LepA069 e LepA388, as quais poderiam estar expostas ou ser secretadas pela bactéria, sugerindo uma possível função de adesina. O estudo da proteína LepA388 levou ao reconhecimento de outras doze proteínas semelhantes e pertencentes a uma família paráloga contendo um domínio denominado DUF_61, motivo de função desconhecida presente em proteínas compartilhadas somente entre as espécies patogênicas mais virulentas de *Leptospira*. Por esta razão, a proteína LepA388 foi a mais estudada. A clonagem de três porções da proteína (LepA388P, LepA388NR e LepA388F) para expressão heteróloga resultou em proteínas recombinantes insolúveis e, considerando a riqueza em resíduos de cisteína presente em sua estrutura, não foi possível renaturá-las adequadamente. Diante dos obstáculos encontrados, apenas a porção contendo a sequência apresentada pelo fago (LepA388P) foi utilizada para obtenção de antissoros em camundongos, os quais apresentaram altos títulos, demonstrando a alta imunogenicidade da proteína LepA388P. O reconhecimento de proteínas nativas da família paráloga DUF_61 em extratos de diferentes sorovares de *Leptospira* não foi observado, assim como sua expressão *in vitro* a partir de bactérias em diferentes condições de cultivo. Estudos adicionais sobre a expressão *in vivo* e funções dos membros desta família são necessários para uma compreensão mais ampla de seu papel na biologia de leptospiras e, possivelmente, na patogênese da leptospirose.

Palavras-chave: *Leptospira interrogans*, adesinas, *shotgun phage display*, seleção

ABSTRACT

Ferreira, F.L. **Identification and evaluation of new adhesins of *Leptospira interrogans* by shotgun phage display**. 2015. 180p. Masters Thesis - Graduate Program in Biological Sciences (Biochemistry). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Leptospirosis is an emerging infectious disease whose etiologic agents are pathogenic species of the genus *Leptospira*. Pathogenic leptospires have countless specific genes encoding proteins with unknown functions, suggesting that leptospires have unique virulence factors. Bacterial adhesins are important virulence factors and so the identification of conserved adhesins in pathogenic *Leptospira* species from shotgun phage display libraries, followed by selection (biopanning) in cells and/or extracellular matrix components, can reveal new antigens and strategies for leptospirosis treatment and prevention. Libraries were constructed using fragmented genomic DNA from *L. interrogans* and pG8SAET phagemid vector. Cloning approaches included blunt-end ligation and techniques based in cohesive-end ligation, such as ORESTES strategy and hairpin linkers. Despite some limitations, cloning by blunt-end ligation was the most efficient for library construction, being adopted for the construction of three libraries on a larger scale. Selection of new possible adhesins was performed by biopanning of the libraries in eukaryotic cells through BRASIL methodology. The first library called BBT1 exhibited approximately 10^6 total clones, and its biopanning resulted in four proteins fused to phage protein VIII, but none of them were expected to be exposed by the bacteria. Other libraries were built (BBT2 and BBT3) which reached the expected number of clones to obtain a larger genome representation (> $2x10^7$ clones). Since it showed the highest proportion of positive clones, BBT2 was selected to perform a second biopanning, resulting in eleven proteins fused to phage protein VIII and/or signal peptide. *In*

silico analysis revealed three hypothetical proteins, named LepA962, LepA069 and LepA388, that would be exposed or secreted by the bacteria, suggesting a possible adhesin function. The study of LepA388 protein led to the recognition of twelve other similar proteins belonging to a paralogous family that contains a domain called DUF_61, domain of unknown function that is present in proteins shared only among the most virulent pathogenic species of *Leptospira*. For this reason, the LepA388 protein was the most studied. The cloning of three portions of the protein (LepA388P, LepA388NR and LepA388F) for heterologous expression resulted in insoluble recombinant proteins, and given the presence of many cysteine residues in its structure, it was not possible to renature them appropriately. In face of the imposed obstacles, only the portion containing the sequence presented by the bacteriophage (LepA388P) was used to obtain antisera in mice, which showed high titers, demonstrating the high immunogenicity of the protein LepA388P. Recognition of native DUF_61 paralogous family proteins in extracts from distinct *Leptospira* serovars was not observed, as well as its *in vitro* expression from bacteria cultured in different conditions. Additional studies on the *in vivo* expression and functions of members of this family are needed for a broader understanding of their role in leptospiral biology and possibly in the pathogenesis of leptospirosis.

Keywords: *Leptospira interrogans*, adhesins, shotgun phage display, biopanning

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14

1.1. *Leptospira* 14
1.1.1. Taxonomia e classificação 14
1.1.2. Morfologia, fisiologia e metabolismo 15
1.1.3. Genomas e genética de *Leptospira* 18
1.2. Leptospirose 20
1.2.1. Ciclo de transmissão e fontes de infecção 20
1.2.2. Epidemiologia e endemia 22
1.2.3. Patologia e manifestações clínicas 24
1.2.4. Diagnóstico, tratamento e prevenção 26
1.3. Adesinas bacterianas 29
1.3.1. Importância da adesão em bactérias 29
1.3.2. Adesinas de *Leptospira* 31
1.4. *Phage display* 35
1.4.1. Fago filamentoso 36
1.4.2. Fagomídeos e fagos auxiliares 37
1.4.3. Tipos de bibliotecas e seleção 39

2. OBJETIVOS 41

2.1. Objetivo geral 41
2.2. Objetivo específicos 41

3. MATERIAIS E MÉTODOS 42

3.1. Organismos, condições de cultivo e vetores 42
3.2. Preparação de bactérias *E. coli* eletrocompetentes 43
3.3. Extração de DNA genômico de *L. interrogans* 45
3.4. Fragmentação do DNA genômico de *L. interrogans* 46
3.5. Amplificação e purificação dos fagomídeos pG8SAET e pG8NHP 46
3.6. Preparação e padronização de amostras para ligação com extremidades cegas (*blunt-end*) 48
3.7. Preparação e padronização de amostras para ligação com extremidades coesivas (técnicas alternativas) 51
3.7.1. Padronização da obtenção de ORESTES 52
3.7.2. Ligação com a utilização de adaptadores 54
3.8. Construção e validação das bibliotecas BBT1, BBT2 e BBT3 57
3.8.1. Construção da Biblioteca 1 (BBT1) 57
3.8.2. Construção das Bibliotecas 2 e 3 (BBT2 e BBT3) 58
3.9. Amplificação, precipitação e titulação do fago auxiliar M13KO7 60
3.10. Cultura de células eucarióticas 62
3.11. *Biopanning* e técnica BRASIL 64
3.11.1. *Biopanning*-BRASIL da biblioteca 1 (BBT1) 65
3.11.1.1. Amplificação dos fagos recombinantes apresentando a BBT1 65
3.11.1.2. Descrição das rodadas de seleção em células LEC 65
3.11.2. *Biopanning*-BRASIL da biblioteca 2 (BBT2) 68

3.11.3. Análise dos clones obtidos a partir dos *biopanning*s 69
3.12. Desenho de oligonucleotídeos para clonagem e expressão de proteínas recombinantes no vetor pAE 70
3.13. Clonagem das sequências selecionadas a partir do *biopanning* 71
3.14. Teste da expressão das proteínas recombinantes em bactérias *E. coli* 76
3.15. Amplificação e expressão de proteínas recombinantes em média escala 78
3.16. Testes para a renaturação das proteínas recombinantes 79
3.16.1. Diálise gradual 80
3.16.2. Renaturação por altas pressões hidrostáticas 81
3.17. Purificação das proteínas recombinantes em 8 M de ureia 83
3.18. Imunização de camundongos com a proteína LepA388P para obtenção de antissoro 84
3.19. Análise do antissoro da proteína LepA388P 85
3.19.1. Titulação por ELISA 85
3.19.2. *Western blotting* com proteínas recombinantes de *Leptospira* 86
3.19.3. Preparação de extratos de *Leptospira* e *Western blotting* com painel de sorovares 87
3.20. Culturas de *L. interrogans* em diferentes temperaturas e osmolaridade 89
3.20.1. Preparação de extratos de *L. interrogans* e imunoprecipitação dos sobrenadantes das culturas 90
3.20.2. *Western blotting* com os extratos e sobrenadantes imunoprecipitados das culturas de *L. interrogans* em diferentes condições de cultivo 91
3.21. Migrações eletroforéticas 91
3.21.1. Eletroforese em gel de agarose 91
3.21.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 92

4. RESULTADOS 93

4.1. Padronização da construção de bibliotecas através de ligação *blunt-end* 93
4.2. Técnicas alternativas para a construção de bibliotecas 97
4.2.1. Padronização da obtenção de ORESTES 98
4.2.2. Ligação com a utilização de adaptadores 100
4.3. Construção e validação das bibliotecas BBT1, BBT2 e BBT3 102
4.4. *Biopanning* e técnica BRASIL 105
4.4.1. *Biopanning*-BRASIL da biblioteca 1 (BBT1) 105
4.4.2. *Biopanning*-BRASIL da biblioteca 2 (BBT2) 108
4.5. Análise e clonagem para expressão das proteínas selecionadas a partir do *biopanning*-BRASIL da BBT2 112
4.5.1. Proteínas LepA962 (Fago 2.10) e LepA069 (Fago 3.21) 112
4.5.2. Proteína LepA388 (Fago 3.25) 114
4.6. Expressão das proteínas recombinantes LepA388P, LepA388NR e LepA388F 122
4.7. Renaturação das proteínas recombinantes LepA388P, LepA388NR e LepA388F 125
4.7.1. Renaturação por diálise gradual 126
4.7.2. Renaturação por altas pressões hidrostáticas 126
4.8. Purificação da proteína recombinante LepA388P 129
4.8.1. Quantificação da proteína recombinante LepA388P purificada 130
4.9. ELISA para titulação do antissoro da proteína recombinante LepA388P 131

4.10. *Western blotting* para análise do antissoro da proteína recombinante LepA388P 133
4.10.1 Teste de especificidade do antissoro 133
4.10.2 Painel de sorovares de *Leptospira* 134
4.11. *Western blotting* para análise da expressão da proteína LepA388 e outras proteínas da família DUF_61 em diferentes culturas de *L. interrogans* 135

5. DISCUSSÃO 140

6. CONCLUSÕES 155

7. APÊNDICES 157

8. REFERÊNCIAS 172

ANEXOS 181

A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA (CEUAIB) 181
B – SÚMULA CURRICULAR 182

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Leptospira*

1.1.1. Taxonomia e classificação

O gênero *Leptospira* consiste em um grupo diverso de bactérias espiroquetas Gram-negativas, as quais incluem espécies saprofíticas de vida livre, espécies encontradas em associação com animais e espécies patogênicas (ZUERNER, 2010). As leptospiras pertencem à ordem *Spirochaetales* que compreende quatro famílias: Spirochaetaceae, Brachyspiraceae, Brevinemataceae e Leptospiraceae. A família Leptospiraceae contém os gêneros *Leptospira*, *Leptonema* e *Turneriella*, definidos por diferenças no conteúdo G+C, na homologia DNA-DNA e sequências do gene de RNA ribossômico (RNAr) 16S (LEVETT, 2015).

As espécies do gênero *Leptospira* são divididas em um grande número de sorovares, definidos pela comparação da aglutinação de antissoros de coelho com antígenos de leptospira homólogos e heterólogos (FAINE *et al.*, 1999). Os sorovares relacionados antigenicamente são agrupados em sorogrupos, os quais não possuem suporte taxonômico, mas são úteis para a compreensão epidemiológica.

O gênero *Leptospira* era inicialmente dividido em duas espécies, *L. interrogans* sensu lato, abrangendo todas as cepas patogênicas, e *L. biflexa* sensu lato, que incluía todas as cepas saprofíticas. Posteriormente, a classificação fenotípica das leptospiras foi substituída por uma classificação genotípica. Estudos com hibridização de DNA resultaram na definição de "genomoespécies", as quais passaram a conter sorovares patogênicos e não patogênicos em uma mesma espécie e, portanto, as genomoespécies assim definidas não correspondiam mais às duas espécies anteriores (*L. interrogans* e *L. biflexa*) (LEVETT, 2001). Atualmente, existem 21 espécies de *Leptospira*, distribuídas em espécies patogênicas (9 espécies), espécies saprofíticas (7 espécies) e outras 5 espécies classificadas como um grupo intermediário, cuja

patogenicidade não é evidente (Figura 1). São reconhecidos mais de 250 sorovares, categorizados em 24 sorogrupos, baseados na heterogeneidade estrutural no componente carboidrato de lipopolissacarídeos (LPS) expostos na superfície de leptospiras (KO *et al.*, 2009; EVANGELISTA & COBURN, 2010; LEVETT, 2015).

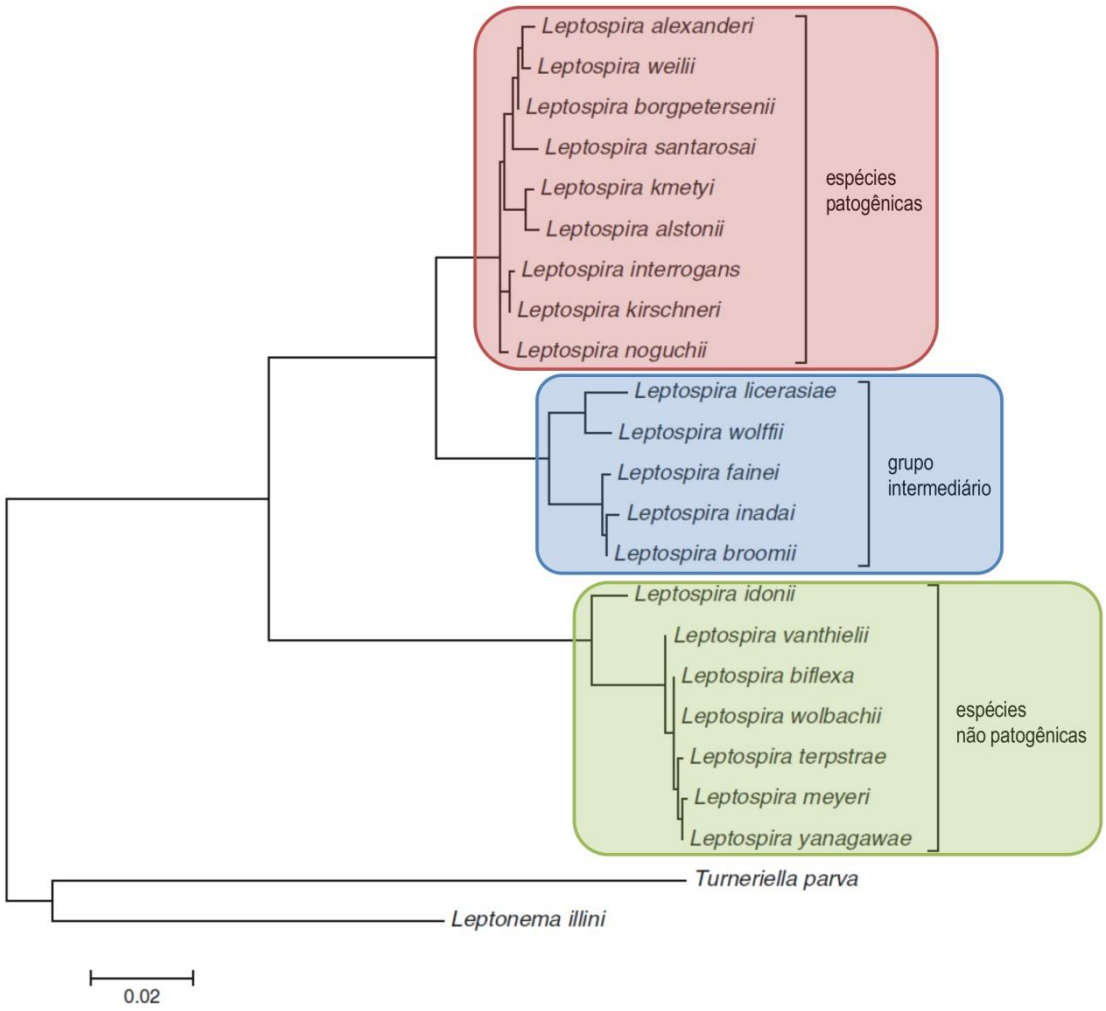


Figura 1. Análise filogenética molecular da família Leptospiraceae, baseadas em sequências do gene do RNA ribossômico 16S, utilizando o método de máxima verossimilhança. Os grupos de espécies patogênicas, espécies não patogênicas e grupo intermediário estão destacados. Figura adaptada de LEVETT, 2015.

1.1.2. Morfologia, fisiologia e metabolismo

Os membros da família Leptospiraceae compartilham algumas características em comum, apresentando-se como células longas, afinadas e flexíveis, com formato em espiral e

alta mobilidade; são aeróbicos ou microaerofílicos obrigatórios e utilizam ácidos graxos de cadeia longa e álcoois graxos como fontes de carbono e energia (ZUERNER, 2010). A família compreende espécies saprofíticas e patogênicas, em que as últimas demonstram a capacidade de infectar diferentes hospedeiros e de sobreviver no meio ambiente.

Bactérias do gênero *Leptospira* possuem forma espiralada com diâmetro médio de aproximadamente 0,1 µm, variação de comprimento de 6 a 20 µm, amplitude helicoidal de 0,1 a 0,15 µm e comprimento de onda de 0,5 µm. Geralmente, espécies patogênicas são mais curtas e mais enroladas do que as espécies saprofíticas e cepas laboratoriais submetidas a passagens seriadas. Quando leptospiras são expostas a condições de alimentação limitantes, elas podem se tornar extremamente alongadas e apresentar mobilidade reduzida, podendo também formar corpos esféricos devido à saúde debilitada das células (CAMERON, 2015).

O envelope celular é similar ao de bactérias Gram-negativas, composto por uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos (LPS), um espaço periplasmático contendo peptidoglicanos e uma membrana interna (citoplasmática). A membrana externa possui LPS em sua face externa, os quais são os principais antígenos de leptospiras e apresentam um importante papel na virulência; entretanto, o LPS de leptospiras é relativamente não tóxico a células ou a animais em comparação ao LPS de *E. coli* (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Os LPSs formam uma camada externa à membrana, exibindo diferentes espessuras entre espécies patogênicas e saprofíticas (9,2 nm e 6,0 nm, respectivamente). O envelope externo também contém proteínas estruturais e funcionais, incluindo principalmente proteínas integrais e as abundantes lipoproteínas (CAMERON, 2015).

A camada de peptidoglicano no espaço periplasmático é responsável pela rigidez, forma e força das leptospiras, assim como em outras bactérias Gram-negativas. Contudo, a camada de peptidoglicano das leptospiras é mais proximamente associada à membrana

citoplasmática (interna) do que à membrana externa, resultando em uma maior fluidez da membrana externa que se encontra fracamente conectada à célula, característica que as difere das bactérias Gram-negativas. Conforme outras bactérias espiroquetas, as leptospiras possuem dois flagelos periplasmáticos, um em cada extremidade, os quais não se sobrepõem ao longo da célula. Os flagelos são responsáveis pela motilidade em rotação direcional que, em combinação com sua estrutura e disposição, resultam nas extremidades curvadas características da família Leptospiraceae (Figura 2), que a distingue das outras famílias de espiroquetas (ZUERNER, 2010). Ao contrário de bactérias que possuem flagelos externos, espécies de *Leptospira* se movimentam com velocidade aumentada sob condições de alta viscosidade, capacidade que pode aumentar a sobrevivência da bactéria em ambientes naturais e a invasão de tecidos por espécies patogênicas, destacando uma correlação essencial entre motilidade e virulência (CAMERON, 2015).

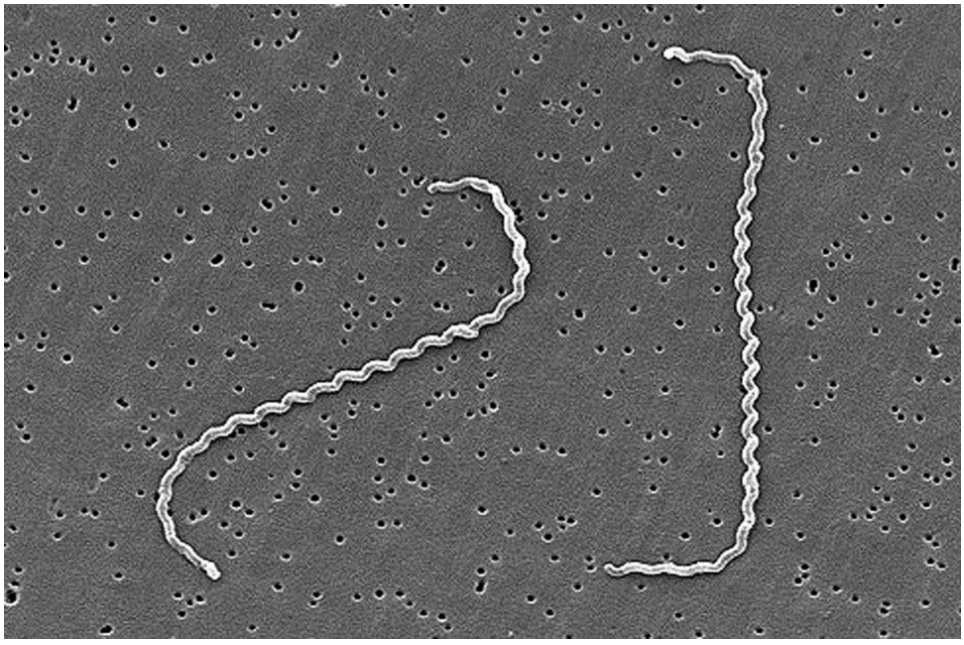


Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura de *Leptospira interrogans* cepa RGA destacando as extremidades curvadas, marcas características da família Leptospiraceae. Imagem obtida da Biblioteca de Imagens de Saúde Pública (*Public Health Image Library* – PHIL/CDC).

Leptospiras são cultivadas sob condições aeróbicas, apresentando uma temperatura de crescimento ideal *in vitro* entre 28°C e 30°C e pH ideal entre 7,2 e 7,6. Espécies saprofíticas e patogênicas podem ser diferenciadas em cultivo, pois apenas as primeiras exibem crescimento em temperaturas baixas (11-13°C) e na presença do análogo de purina 8-azaguanina, enquanto que as últimas podem crescer a 37°C e formam células esféricas na presença de 1 M de NaCl. O crescimento máximo em cultura ocorre em 2 a 3 dias para espécies saprofíticas e em 4 a 7 dias para espécies patogênicas (FAINE *et al.*, 1999; LEVETT, 2001).

1.1.3. Genomas e genética de *Leptospira*

A partir do sequenciamento de genomas de duas espécies patogênicas (*L. interrogans* e *L. borgpetersenii*) e de uma espécie saprofítica (*L. biflexa*), houve um grande avanço para o conhecimento das espécies de *Leptospira* e sua patogenicidade (BHARTI *et al.*, 2003). Atualmente, as cepas patogênicas com os genomas completamente sequenciados incluem *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (NASCIMENTO *et al.*, 2004), *L. interrogans* sorovar Lai cepa 56601 (REN *et al.*, 2003), *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis cepa L550 e *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis cepa JB197 (BULACH *et al.*, 2006). A cepa *L. biflexa* sorovar Patoc cepa 'Patoc 1 (Paris)' (PICARDEAU *et al.*, 2008) é a única saprofítica com genoma completo. O sequenciamento de outros genomas completos se encontra em andamento, incluindo a cepa patogênica *L. santarosai* sorovar Shermani cepa LT 821 (CHOU *et al.*, 2012) e a cepa do grupo intermediário *L. licerasiae* sorovar Varillal cepa VAR 010 (RICALDI *et al.*, 2012).

As espécies de *Leptospira* possuem genoma relativamente grande (3,9-4,6 Mb), em comparação a outras espiroquetas como *Treponema pallidum* (1,1 Mb) e *Borrelia burgdorferi* (1,5 Mb). Apresentam conteúdo G+C de 35 a 42% e pelo menos dois cromossomos circulares: um maior com mais de 3,6 Mb e densidade gênica entre 75-92%, o qual codifica

principalmente genes de função "*housekeeping*", e um menor com 278-350 kb, sendo carreador de alguns genes essenciais. Um terceiro replicon, chamado p74 (74 kb, 36% G+C) foi identificado apenas em *L. bifexa*, e a presença de genes "*housekeeping*" em p74 com ortólogos em espécies patogênicas sugere que este replicon é essencial para a sobrevivência de *L. biflexa*. Sequências de inserção (IS) e ilhas genômicas relacionadas a fagos podem estar presentes nos genomas, em quantidades variadas dependendo do sorovar analisado (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; PICARDEAU, 2015).

A espécie patogênica *L. interrogans* possui genoma de aproximadamente 4,6 Mb e conteúdo G+C de 35,1%, enquanto que a também patogênica *L. borgpetersenii* possui genoma com 700 kb menor (3,9 Mb, 40,2% G+C). A análise do conteúdo gênico de *L. borgpetersenii* mostrou que aproximadamente 12% das sequências codificadoras (CDS) correspondem a transposases ou são pseudogenes, e muitos genes que estão intactos em *L. interrogans* apresentam acúmulo de mutações em *L. borgpetersenii*. A redução no tamanho do genoma e o contínuo decaimento gênico e de funções em *L. borgpetersenii* são correlacionados à sua condição de patógeno estrito e à sua inabilidade de sobreviver fora do hospedeiro, enquanto que *L. interrogans* é capaz de sobreviver a algumas passagens em ambientes aquáticos, aumentando suas chances de infectar novos hospedeiros (BULACH *et al.*, 2006; PICARDEAU, 2015).

Os genomas sequenciados de *Leptospira* até o momento compartilham 1.547 proteínas em comum, como genes "*housekeeping*", transportadores ABC, lipoproteínas e genes de flagelo e de quimiotaxia. Genes envolvidos na biossíntese dos flagelos periplasmáticos são compartilhados com outras bactérias espiroquetas, pois tais flagelos possuem uma estrutura única nestas bactérias. A espécie saprofítica *L. biflexa* possui muitos genes que estão ausentes nas espécies patogênicas, apresentando um número maior de genes que codificam proteínas de sensoriamento do ambiente e de aquisição de nutrientes, refletindo sua capacidade de

sobreviver em diversos ambientes (PICARDEAU, 2015). Entretanto, os genes únicos às espécies patogênicas são mais interessantes; as leptospiras contêm aproximadamente 35% de genes putativos que codificam proteínas de função desconhecida, mas entre as proteínas únicas em *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, 78% e 58% possuem função indefinida, respectivamente. A alta representação de genes codificadores de proteínas com função desconhecida em espécies patogênicas de *Leptospira* indica que tais espécies possuem fatores de virulência únicos, os quais não podem ser identificados a partir de análises bioinformáticas envolvendo comparações a outras bactérias (ADLER *et al.*, 2011).

A análise genética de *Leptospira* encontrou obstáculos iniciais, impedindo que sua compreensão acompanhasse o ritmo da análise de outras espécies bacterianas. Com a descoberta do bacteriófago LE1 de 74 kb em *L. biflexa*, o qual consegue se replicar como um plasmídeo circular, o desenvolvimento de um vetor "*shuttle*" *E. coli-L. biflexa* tornou-se possível, incluindo a origem de replicação de LE1 e marcadores de resistência a antibióticos. Este replicon pode ser introduzido em leptospiras por eletroporação para replicação na espécie saprofítica *L. biflexa*, mas não em leptospiras patogênicas. Um recente estudo de conjugação entre *E. coli* e espécies de *Leptospira* utilizando o plasmídeo RP4 sugere um método alternativo para a transformação de leptospiras com DNA recombinante (PICARDEAU, 2008; EVANGELISTA & COBURN, 2010).

1.2. Leptospirose

1.2.1. Ciclo de transmissão e fontes de infecção

Espécies patogênicas de *Leptospira* são agentes etiológicos da leptospirose, doença zoonótica amplamente difundida pelo mundo e atualmente considerada como uma doença infecciosa emergente. O ciclo de transmissão de leptospiras envolve a liberação de bactérias pela urina, persistência no ambiente, onde a bactéria sobrevive por semanas ou meses em solo

úmido ou água através da formação de agregados celulares e biofilmes, infecção de novos hospedeiros e disseminação hematógena em direção aos rins, nos quais as leptospiras colonizam as microvilosidades do epitélio dos túbulos renais proximais. A colonização de ampla variedade de hospedeiros de manutenção (definitivos) resulta na persistente liberação de bactérias pela urina, podendo se manter por longos períodos durante sua vida (KO *et al.*, 2009; HAAKE & LEVETT, 2015).

Mamíferos pequenos são os reservatórios mais importantes, principalmente roedores e marsupiais, e carreadores domésticos como gado, porcos e cachorros também compõem fontes de infecção significativas (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Sorovares de *Leptospira* podem apresentar hospedeiros preferenciais, apesar de não totalmente exclusivos. Alguns exemplos incluem a relação hospedeiro-sorovar ubíqua entre ratos e o sorovar Icterohaemorrhagiae, e entre camundongos e os sorovares do sorogrupo Ballum. Geralmente, os sorovares não causam doenças graves em hospedeiros definitivos aos quais são altamente adaptados; nestes casos, a infecção por leptospira pode ser considerada como uma relação comensal.

Entretanto, a leptospirose em hospedeiros acidentais (temporários) pode causar infecções com manifestações agudas e crônicas e tais hospedeiros podem carregar e liberar as bactérias por durações variáveis, dependendo da espécie (KO *et al.*, 2009). Humanos são exemplos de hospedeiros acidentais em que infecções por leptospiras estimulam desde manifestações assintomáticas até doenças agudas severas, podendo ser ocasionalmente fatais (Figura 3). Porém, humanos não constituem fontes de transmissão epidemiológicas importantes, ainda que raras transmissões entre humanos tenham sido relatados durante relações sexuais, lactação e gravidez, resultando em abortos ou natimortos (HAAKE & LEVETT, 2015). Como exceção à maioria dos roedores, hamsters e cobaias são altamente

susceptíveis a leptospirose e, portanto, são frequentemente utilizados como modelos animais para a leptospirose humana (KO *et al.*, 2009).

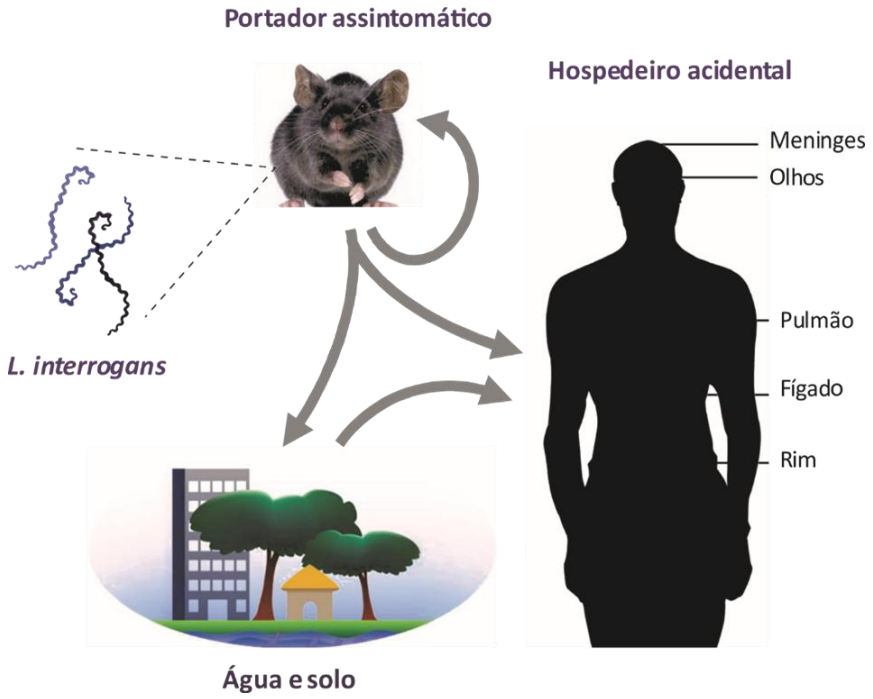


Figura 3. Esquema simplificado do ciclo de vida da espécie patogênica *L. interrogans*. Roedores infectados são portadores assintomáticos da leptospirose e liberam bactérias continuamente no ambiente através de sua urina, contaminando água e solo. Humanos são hospedeiros acidentais, onde as leptospiras podem estabelecer uma infecção sistêmica e causar doenças agudas severas, as quais podem ser ocasionalmente fatais.

1.2.2. Epidemiologia e endemia

A exposição de humanos e animais a leptospiras pode ocorrer através de contato direto com um animal infectado e/ou sua urina, ou através de contato indireto por meio de água ou solo contaminados com a urina de um animal infectado. Infecções em humanos podem estar relacionadas a profissões de risco e exposições recreativas. As ocupações que fornecem risco de contato direto com animais potencialmente infectados incluem agricultores, veterinários, empregados em matadouros, ordenhadores, empregados em abrigos animais, cientistas e tecnologistas que manipulam animais em laboratórios ou durante trabalho de campo. A importância relativa destas ocupações de risco diminuiu a partir da implantação de medidas

protetoras como o uso de equipamentos de proteção pessoal (BHARTI *et al.*, 2003; HAAKE & LEVETT, 2015). Além das profissões citadas acima, outras ocupações estão em risco de contato indireto com leptospiras, como empregados em esgotos e em mineração, soldados, piscicultores, empregados em campos de arroz e em fazendas de banana, e cortadores de cana de açúcar (LEVETT, 2001).

Quanto às exposições recreativas, existe um risco significativo associado a esportes aquáticos, envolvendo natação, canoagem, rafting, pescaria em água doce e espeleologia. Este tipo de exposição se intensificou nas últimas décadas, devido à maior popularidade de esportes de aventura e competições realizados principalmente em destinos exóticos. Participantes em eventos internacionais podem ser infectados e desenvolver doença após retornar para seus países de origem, o que resulta em maior dificuldade de reconhecimento e investigação dos surtos de leptospirose (HAAKE & LEVETT, 2015).

A leptospirose humana possui ampla distribuição geográfica, sendo altamente endêmica em regiões tropicais como Sudeste Asiático, Oceania, Subcontinente Indiano e Américas Latina e Caribenha. Frequentemente, os surtos em tais regiões estão associados com alta pluviosidade devido a mudanças climáticas, como chuvas excessivas relacionadas ao fenômeno El Niño, gerando enchentes e o consequente escoamento de leptospiras em solos para corpos de água, contribuindo para a dispersão das bactérias em águas contaminadas. Regiões tropicais englobam muitos países em desenvolvimento, os quais sofrem com más condições sanitárias e de habitação, exacerbando o risco de exposição às leptospiras em comunidades rurais e urbanas. Nestes países, a epidemiologia da leptospirose sofreu uma mudança: no lugar de problemas rurais isolados, a doença passou a ser um destaque urbano, devido à crescente migração da população para áreas urbanas, as quais passaram a viver em condições inadequadas com maiores fatores de risco, conduzindo ao aumento na leptospirose transmitida por roedores (EVANGELISTA & COBURN, 2010). Outro fator que contribui

para a maior incidência da doença em países de clima tropical é a maior sobrevivência de leptospiras em ambientes úmidos e quentes (LEVETT, 2001).

Segundo o relatório da Organização Mundial da Saúde de 2011, a incidência média global da leptospirose humana endêmica foi de 5 casos a cada 100.000 indivíduos, enquanto que a média da leptospirose epidêmica foi de 14 casos a cada 100.000 indivíduos. As taxas de leptospirose humana endêmica variaram de apenas 0,5/100.000 casos na Europa até 975/100.000 casos na África. A incidência da doença é maior em homens com mais de 59 anos (73,6/100.000 casos), enquanto que as mulheres são menos afetadas (38,9/100.000 casos em mulheres entre 50-59 anos) (WHO, 2011).

A leptospirose também constitui um grande problema de saúde animal, pois é uma das principais doenças veterinárias com alto custo econômico associado. A doença provoca uma variedade de manifestações crônicas em gado, porcos, ovelhas e cabras, sendo responsável por perdas reprodutivas, produção de leite reduzida, natimortos e abortos (EVANGELISTA & COBURN, 2010).

1.2.3. Patologia e manifestações clínicas

A primeira fase na patogênese da leptospirose é a entrada no hospedeiro. A penetração das barreiras teciduais ocorre através de cortes ou abrasões na pele ou membranas mucosas da cavidade oral ou da conjuntiva. A segunda fase na patogênese consiste na disseminação hematógena, em que as leptospiras alcançam a corrente sanguínea, onde permanecem durante os estágios iniciais da doença. A apresentação clínica da leptospirose é bifásica, com a fase aguda (bacteremia) com duração de aproximadamente uma semana, seguida pela fase imune, caracterizada pela produção de anticorpos, remoção das bactérias do sangue e excreção de leptospiras na urina (LEVETT, 2001). Ao contrário de outras infecções bacterianas, a duração prolongada e os altos níveis de bacteremia que ocorrem na leptospirose (10^4-10^6 bactérias/ml

de sangue) são resultantes do baixo potencial endotóxico do LPS de leptospiras. Em humanos, a resposta imune inata ativada pelo LPS de leptospiras é de receptores do tipo Toll 2 (TLR2), no lugar do TLR4 que é responsável pelo reconhecimento do LPS da maioria das bactérias (KO *et al.*, 2009).

O período de incubação para a leptospirose possui variação de 2 a 30 dias. A grande maioria das infecções por leptospiras são assintomáticas ou provocam sintomas leves, e os pacientes geralmente não procuram ajuda médica. Os casos de leptospirose reconhecidos correspondem a uma pequena parcela das infecções. Estes casos são caracterizados por febre, calafrios e cefaleia, sintomas inespecíficos que também ocorrem com outras síndromes febris agudas como influenza, dengue e malária (HAAKE & LEVETT, 2015). Esta é a síndrome anictérica, com duração de aproximadamente uma semana e seu término geralmente coincide com o surgimento dos anticorpos na fase imune da doença (LEVETT, 2001).

Um subconjunto dos pacientes com leptospirose reconhecida (5-15%) podem desenvolver manifestações mais severas e tardias. O início da doença ocorre na fase imune da doença, em que anticorpos aglutinadores são produzidos e as leptospiras são removidas do sangue através de opsonização mediada por anticorpos, seguida por lise celular. A leptospirose severa tem como característica principal o dano endotelial vascular, provocando extravasamento capilar e hemorragia. A doença também é caracterizada por disfunção em múltiplos órgãos, incluindo fígado, rins, pulmões e cérebro. A doença de Weil é a apresentação clássica da leptospirose severa, sendo caracterizada por icterícia, insuficiência renal aguda e hemorragia. A síndrome pulmonar hemorrágica associada à leptospirose (LPHS) é uma forma de doença severa emergente, caracterizada por hemorragia alveolar extensa, para a qual a taxa de fatalidade é maior que 50% (KO *et al.*, 2009).

O desenvolvimento da leptospirose e a progressão da severidade da doença são influenciados por fatores intrínsecos ao hospedeiro, pela quantidade de bactérias infectantes

que penetraram no hospedeiro e pelos fatores de virulência apresentados pela cepa infectante. Pacientes que possuem o alelo HLA-DQ6 apresentam maior risco de doença, sugerindo um importante papel da estimulação de linfócitos por um superantígeno de leptospira (HAAKE & LEVETT, 2015). Assim como outras bactérias patogênicas, as leptospiras apresentam fatores de virulência que auxiliam na penetração do hospedeiro e no estabelecimento da infecção. Os fatores identificados até hoje são principalmente proteínas de superfície, as quais são consideradas como mediadoras da interação entre a bactéria com os tecidos do hospedeiro (Loa22, LipL32 e proteínas Lig, por exemplo). O genoma das espécies de *Leptospira* codifica uma variedade de hemolisinas e proteases que podem facilitar na invasão dos tecidos, e proteínas associadas à mobilidade das bactérias também podem ser consideradas como fatores de virulência. Adicionalmente, alguns sorovares de *Leptospira* são geralmente mais associados a doenças severas em humanos do que outros; uma maior diversidade de fatores de virulência pode explicar este fenômeno (KO *et al.*, 2009).

1.2.4. Diagnóstico, tratamento e prevenção

O diagnóstico da leptospirose pode ser realizado com culturas, testes moleculares e sorológicos. A coleta dos materiais adequados e a seleção dos testes para diagnóstico dependem da fase da infecção e da duração dos sintomas. O diagnóstico molecular é o único teste sensível na fase aguda e pode ser feito com amostras de sangue, urina, líquido cerebrospinal (LCR) e outros tecidos, entre 5 a 10 dias após a infecção. Entretanto, além da inabilidade de identificação do sorovar infectante, é necessário um espaço laboratorial dedicado com equipamentos especiais e analistas altamente qualificados, fatores muitas vezes ausentes nas áreas de maior incidência da doença. O cultivo de leptospiras para diagnóstico pode ser realizado nos primeiros 10 dias após a infecção com as mesmas amostras, porém, requer meio de cultura especializado (meio EMJH - Ellinghausen-McCullough-Johnson-

Harris) e possui longo período de processamento (semanas ou até meses), além de ser de difícil execução e apresentar baixa sensibilidade (MUSSO & LA SCOLA, 2013).

A maioria dos casos de leptospirose é diagnosticada através de testes sorológicos, devido à capacidade limitante dos testes moleculares e de cultura, podendo ser gênero-específicos ou sorogrupo-específicos. Tais testes podem ser efetuados pelo menos 6 dias após a infecção, o que coincide com o início da fase imune da doença. O teste de aglutinação microscópica (MAT) é o diagnóstico padrão ouro para a detecção e identificação do sorogrupo infectante, apesar da necessidade de ser realizado em laboratórios de referência, com a manutenção de culturas de leptospiras. Testes sorológicos rápidos para a detecção de anticorpos durante a fase aguda da doença (detecção de IgM) foram desenvolvidos e podem ser efetuados sem a necessidade de equipamentos especializados; contudo, a confirmação por MAT ainda é essencial (HAAKE & LEVETT, 2015).

Como a maioria dos casos de leptospirose aguda é revertida espontaneamente, o uso de tratamento antimicrobiótico permanece controverso. No entanto, quando há evidências clínicas e epidemiológicas de leptospirose, especialistas preferem adotar o tratamento, pois a administração precoce de antimicrobianos a pacientes com leptospirose pode impedir a progressão da doença para quadros mais severos (BHARTI *et al.*, 2003). Indivíduos na fase inicial da doença são tratados com doxiciclina ou azitromicina, enquanto que a terapia para pacientes hospitalizados com doença severa geralmente envolve penicilina intravenosa, ampicilina, ceftriaxona e cefotaxima. O composto antibacteriano doxiciclina apresentou eficácia para a profilaxia temporária em ambientes de alto risco de infecções, além de mostrar redução na duração e na severidade da doença em pacientes com leptospirose anictérica (LEVETT, 2001).

A prevenção da leptospirose inclui estratégias baseadas no conhecimento da epidemiologia da doença local e os mecanismos de transmissão envolvidos, porém, medidas

que não envolvem vacinação são de difícil aplicação. Em países que a leptospirose humana está associada a más condições sanitárias e de moradia, a redução da população de roedores pode trazer benefícios em curto prazo, mas o uso de venenos pode fornecer riscos a crianças e animais selvagens. Outras opções englobam a construção de habitações adequadas que previnam a invasão por roedores e projetos para controlar a inundação de áreas residenciais que sofrem com enchentes, mas tais medidas exigem altos custos que países em desenvolvimento não podem arcar (HAAKE & LEVETT, 2015). Trabalhadores cujas atividades ocupacionais oferecem risco de contato direto e/ou indireto com animais infectados e sua urina podem adotar o uso de equipamentos de proteção pessoal, como luvas, botas e óculos, a fim de prevenir a exposição da pele e de membranas mucosas. Tais medidas também possuem grande dificuldade de implementação devido à baixa aceitação entre trabalhadores e empregadores (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). O controle de animais com infecção aguda ou crônica através de diagnóstico preciso seguido por tratamento pode ajudar a diminuir o risco da leptospirose humana.

Vacinas contra a leptospirose têm sido desenvolvidas logo após o primeiro isolamento de leptospiras patogênicas no início do século passado (IDO *et al.*, 1916). As primeiras vacinas eram constituídas por bactérias inativadas e diversos métodos para realizar a inativação das leptospiras foram estudados, incluindo calor, formalina, fenol, etanol, congelamento-descongelamento e irradiação. Mesmo após cem anos de pesquisa, vacinas com células inteiras e inativadas (bacterinas) são as únicas vacinas atualmente licenciadas. As vacinas de bacterinas têm sido utilizadas amplamente em animais, como gado, suínos e cachorros, contribuindo extensivamente para a diminuição do risco da leptospirose humana em atividades ocupacionais. Em humanos, o uso de vacinas com células inativadas está disponível apenas em algumas regiões, como China, Japão, Cuba e Europa, onde são administradas com sucesso após a realização de grandes testes clínicos para a determinação de

sua eficácia. Entretanto, as vacinas de bacterina não foram licenciadas para uso humano generalizado devido a outras importantes considerações: tais vacinas estão associadas a altas taxas de reações adversas e, como a imunidade ativada por essas vacinas é direcionada principalmente ao LPS da leptospira utilizada, a resposta é sorovar-específica e de curta duração, pois o LPS é um antígeno T-independente e, portanto, não induz memória imunológica (ADLER, 2015). Adicionalmente, as vacinas baseadas em células inativadas são geralmente ineficientes para prevenir a colonização e o transporte das bactérias, limitando seu uso como intervenção para bloquear a transmissão da doença (KO *et al.*, 2009).

Devidos às limitações apresentadas pelas vacinas de bacterina, estudos foram focados no desenvolvimento de vacinas de subunidades, constituídas por proteínas associadas à superfície das leptospiras e conservadas entre vários sorovares. Apesar de alguns resultados promissores, muitos estudos relatados na literatura apresentam doses de desafio inadequadas, ausência de reprodutibilidade e análises estatísticas inapropriadas (ADLER, 2015). É importante que o desenvolvimento de novas vacinas seja baseado em uma melhor compreensão da membrana externa de leptospiras, assim como na capacidade antigênica e imunogênica de seus componentes.

1.3. Adesinas bacterianas

1.3.1. Importância da adesão em bactérias

O primeiro relato de adesão bacteriana a células do hospedeiro ocorreu em 1908, em que foi observada a hemaglutinação de células animais por bactérias *Escherichia coli*. Bactérias tendem a aderir em superfícies, seja para a formação de biofilmes no ambiente ou para a colonização de células e tecidos de hospedeiros (KLINE *et al.*, 2009). O sucesso das infecções por bactérias patogênicas requer adesão a células do hospedeiro, colonização de

tecidos e, em alguns casos, invasão celular, permitindo a disseminação para outros tecidos e sua persistência no organismo (PIZARRO-CERDÁ & COSSART, 2006).

Inicialmente, a adesão bacteriana a superfícies do hospedeiro era considerada apenas uma forma para a bactéria colonizar um sítio específico e evitar sua remoção por secreções mucosas e peristaltismo. Entretanto, as proteínas bacterianas dependem das interações com seus ligantes para mediar uma série de eventos sinalizadores que podem afetar a invasão bacteriana e/ou promover eventos pró- ou anti-inflamatórios (KLINE *et al.*, 2009). Adesão seguida de invasão permite que a bactéria escape da resposta imune humoral e prolifere em nichos imunoprivilegiados (NIEMANN *et al.*, 2004). Algumas bactérias apresentam outra estratégia para escapar de respostas do hospedeiro pela produção de cápsulas polissacarídicas que podem envolver as moléculas antigênicas completamente ou podem ser coexpressas com outros antígenos bacterianos. As cápsulas promovem a adesão das bactérias e fornecem resistência ao sistema imune do hospedeiro (MERINO & TOMÁS, 2010).

As bactérias patogênicas apresentam um conjunto extremamente diverso de organelas de superfície e toxinas secretadas que possibilitam a conquista de diferentes nichos durante o curso da infecção. As ferramentas para adesão e invasão celulares variam de proteínas monoméricas a macromoléculas multiméricas, as quais realizam funções altamente sofisticadas. Moléculas adesivas podem ser classificadas como fímbrias, sendo organelas poliméricas semelhantes a pelos que se sobressaem da superfície das bactérias e cuja função é aderir a bactéria a uma superfície, ou como adesinas, proteínas de superfície não poliméricas e especializadas cuja função é mediar a adesão bacteriana ao hospedeiro através do reconhecimento de diferentes elementos na superfície celular dos hospedeiros, incluindo componentes da matriz extracelular (PIZARRO-CERDÁ & COSSART, 2006; KLINE *et al.*, 2009).

As adesinas estão entre as primeiras moléculas bacterianas a realizarem contato físico com o hospedeiro (NIEMANN *et al.*, 2004). Adesinas de diferentes espécies de bactérias patogênicas reconhecem glicoproteínas adesivas como vitronectina, fibrinogênio e fibronectina, as quais podem ser secretadas ou permanecerem associadas à membrana plasmática celular. Receptores integrais da membrana de hospedeiros, incluindo integrinas, caderinas, selectinas e CEACAMs (*Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule*s) constituem receptores para adesão de muitos patógenos, podendo também promover a invasão celular. Adesinas que se ligam a matriz extracelular são chamadas de componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas de matriz adesivas ou proteínas MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) (PIZARRO-CERDÁ & COSSART, 2006).

Devido à grande importância da adesão para a infecção de bactérias patogênicas, as proteínas adesivas têm sido extensivamente estudadas para a compreensão de sua interação com moléculas do hospedeiro. Diversas adesinas mostraram ser protetoras em modelos animais, sugerindo que as adesinas podem ser candidatas potenciais para o desenvolvimento de vacinas de subunidade. Alguns exemplos incluem a fímbria FimH de *E. coli* uropatogênica (UPEC), o autotransportador trimérico YadA de *Yersinia enterocolitica* e o complexo chaperona da adesina SafD/F de *Salmonella enteritidis* (KLINE *et al.*, 2009).

1.3.2. Adesinas de *Leptospira*

Assim como outros patógenos microbianos, as leptospiras aderem aos componentes de tecidos do hospedeiro, sendo um passo inicial e necessário para a infecção e patogênese. A ligação a células do hospedeiro e a componentes da matriz extracelular é provavelmente necessária, permitindo que as leptospiras penetrem, disseminem e persistam em tecidos de hospedeiros mamíferos. Diversos candidatos a fatores de virulência foram identificados que

podem contribuir para a patogênese da infecção de *Leptospira* e ao desenvolvimento dos sintomas da doença, incluindo LPS (fator de virulência geral de bactérias Gram-negativas), hemolisinas, proteínas da membrana externa (*OMPs*) e outras proteínas de superfície, assim como moléculas de adesão (EVANGELISTA & COBURN, 2010).

Os principais fatores de virulência identificados até hoje são adesinas. *OMPs* são boas candidatas a adesinas de leptospiras por serem expostas na superfície. No entanto, a presença na superfície de leptospiras foi demonstrada experimentalmente para poucas proteínas. As principais *OMPs* identificadas incluem Loa22, LipL32, proteína contendo o domínio do tipo imunoglobulina (proteínas Lig), LenA, LenD e OmpL1 (KO *et al.*, 2009). Grande parte das adesinas candidatas foi avaliada para adesão aos componentes da matriz extracelular e a proteínas solúveis do hospedeiro. Proteínas de *Leptospira* apresentam diferentes especificidades de ligação a moléculas da matriz extracelular: enquanto proteínas como Lsa27 e rLIC12796 são ligantes exclusivos de laminina, outras proteínas como LigB, Lsa21 e LipL53 possuem um maior espectro de ligação. Adicionalmente, as proteínas como Lsa33, Lsa20 e Lsa26 demonstraram interação adicional ao plasminogênio e, portanto, podem participar na invasão e disseminação de leptospiras no hospedeiro. Algumas proteínas também são capazes de capturar C4bp, um regulador da via clássica do sistema complemento, indicando um importante papel na evasão do sistema imune em leptospiras (Tabela 1) (DOMINGOS *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2014).

Tabela 1

Relação de algumas proteínas com função de adesinas de *Leptospira sp*. e seus ligantes identificados na literatura.

Proteína	**Ligantes**	**Referências**
LenA, Lsa24	Laminina Plasminogênio Fator H FHL-1	(BARBOSA *et al.*, 2006; VERMA *et al.*, 2006, 2010; STEVENSON *et al.*, 2007)

Tabela 1 - Continuação

Proteína	**Ligantes**	**Referências**
LenB, LenC, LenD, LenE, LenF	Fibronectina Laminina	(STEVENSON *et al.*, 2007)
LigA	Colágeno I, IV Laminina Fibronectina Tropoelastina Fibrinogênio Fator H FHL-1 FHR-1 C4bp	(CHOY *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2009; CASTIBLANCO-VALENCIA *et al.*, 2012)
LigB	Colágeno I, III, IV Laminina Fibronectina Elastina Tropoelastina Heparina Fibrinogênio Fator H FHL-1 FHR-1 C4bp	(CHOY *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2009; CASTIBLANCO-VALENCIA *et al.*, 2012; CHING *et al.*, 2012)
LipL32	Laminina Colágeno I, IV, V, XX Fibronectina Plasminogênio	(HAUK *et al.*, 2008; HOKE *et al.*, 2008; MURRAY *et al.*, 2009a, 2009b; VIEIRA *et al.*, 2010; CHAEMCHUEN *et al.*, 2011)
LipL53	Laminina Colágeno IV Fibronectina	(OLIVEIRA *et al.*, 2010)
Lp95	Laminina Fibronectina	(ATZINGEN *et al.*, 2009)
Lsa20	Laminina Plasminogênio	(MENDES *et al.*, 2011)
Lsa21	Laminina Colágeno IV Fibronectina	(ATZINGEN *et al.*, 2008)
Lsa25	Laminina C4bp	(DOMINGOS *et al.*, 2012)
Lsa27	Laminina	(LONGHI *et al.*, 2009)

Tabela 1 - Continuação

Proteína	**Ligantes**	**Referências**
Lsa30	Laminina Fibronectina Plasminogênio C4bp	(SOUZA *et al.*, 2012)
Lsa33	Laminina Plasminogênio C4bp	(DOMINGOS *et al.*, 2012)
Lsa63	Laminina Colágeno IV	(VIEIRA *et al.*, 2010)
Lsa66	Laminina Fibronectina Plasminogênio	(OLIVEIRA *et al.*, 2011; PINNE *et al.*, 2012)
OmpL1	Laminina Fibronectina Plasminogênio	(FERNANDES *et al.*, 2012)
OmpL37	Laminina Fibronectina Elastina Fibrinogênio	(PINNE *et al.*, 2010)
OmpL47	Laminina Colágeno III Fibronectina Elastina Fibrinogênio	(PINNE *et al.*, 2010)
rLIC12796	Laminina	(LIMA *et al.*, 2013)
TlyC	Laminina Colágeno IV Fibronectina	(CARVALHO *et al.*, 2009)

Algumas *OMPs* mostraram-se promissoras como vacinas de subunidades. A combinação entre proteínas OmpL1 e LipL41 induziu proteção sinergética contra infecções letais em hamsters. LipL32 induziu imunoproteção quando administrada como DNA ou nos sistemas vetores BCG (bacilo *Mycobacterium bovis* Calmette-Guérin) e adenovírus. Experimentos com as proteínas Lig mostraram que, como vacinas, elas conferiram alto nível de proteção em camundongos e hamsters (KO *et al.*, 2009), apesar de não impedir a colonização renal pelas bactérias.

1.4. *Phage display*

Em 1985, Smith descreveu uma das primeiras ferramentas genéticas para o estudo de interações proteína-ligante, envolvendo a apresentação de peptídeos ou proteínas recombinantes na superfície de partículas de bacteriófagos, os quais poderiam ser posteriormente selecionados através da interação com ligantes imobilizados: a tecnologia de *phage display* (SMITH, 1985). A técnica envolve a fusão de sequências de DNA externas ao genoma de fagos, resultando em proteínas recombinantes expressas em fusão com uma das proteínas capsidiais do fago utilizado. As vantagens do uso de *phage display* envolvem a habilidade de manter uma conexão física entre a proteína apresentada e sua sequência de DNA codificadora, além de exibir bibliotecas contendo milhões de peptídeos e proteínas únicos (MULLEN *et al.*, 2006). Os bacteriófagos geralmente utilizados são fagos filamentosos de *Escherichia coli* da classe Ff, incluindo as linhagens M13, fd e f1. A característica principal dos fagos filamentosos em sua aplicação em *phage display* é a montagem das partículas virais no citoplasma e posterior secreção a partir de bactérias infectadas, sem promover lise celular (CLACKSON & LOWMAN, 2004).

Atualmente, a tecnologia de *phage display* é utilizada em diversas aplicações, incluindo o mapeamento de epítopos, construção e desenvolvimento de anticorpos e seleção de agonistas e antagonistas de receptores específicos. A técnica tem sido empregada no estudo das interações infecciosas entre micro-organismos patogênicos e seus hospedeiros e, em particular, revelou-se bem sucedida na identificação de adesinas microbianas, componentes vitais para a colonização dos patógenos (MULLEN *et al.*, 2006). Em nosso laboratório, foi demonstrada a interação da proteína LigB à heparina/heparan sulfato, sugerindo que heparan sulfato pode mediar a adesão de *L. interrogans* ao hospedeiro. Da mesma forma, a lipoproteína LIC12976 foi identificada, a qual é conservada em sorovares patogênicos de *L. interrogans* e é capaz de se ligar a células de mamíferos e à laminina (CHING *et al.*, 2012;

LIMA *et al.*, 2013). Recentemente, outros grupos também adotaram esta metodologia, demonstrando a ligação das proteínas LIC11574 e LIC13411 com VE-caderina (receptor de células endoteliais para *L. interrogans*) (EVANGELISTA *et al.*, 2014).

1.4.1. Fago filamentoso

A partícula dos bacteriófagos da classe Ff possui aproximadamente diâmetro de 6,5 nm e comprimento de 930 nm. Seu genoma é constituído por uma molécula de DNA circular de fita simples com cerca de 6,4 kb, o qual é envolvido por um cilindro proteico flexível (vírion). Seu DNA possui 9 genes que codificam 11 proteínas e uma região intergênica (IG) que contém o sinal de empacotamento e as origens de replicação para a síntese da fita viral (fita +, que possui a mesma polaridade do RNA mensageiro) e da fita complementar (fita -). Os genes são agrupados de acordo com sua função no ciclo de vida do fago: os genes II e V codificam proteínas (pII, pX e pV, respectivamente) envolvidas na replicação do genoma, os genes I e IV codificam proteínas (pI, pXI e pIV, respectivamente) envolvidas na montagem do bacteriófago e os genes III, VI, VII, VIII e IX codificam as proteínas capsidiais (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX, respectivamente). O vírion é recoberto por ~2.700 moléculas da principal proteína capsidial, a pVIII; uma das extremidades é composta por ~5 moléculas das proteínas pVII e pIX, enquanto que a outra extremidade é composta por ~5 moléculas das proteínas pIII e pVI (Figura 4) (BARBAS *et al.*, 2001; CLACKSON & LOWMAN, 2004).

O ciclo de vida do bacteriófago filamentoso é iniciado com infecção de células portadoras da fímbria do tipo F, à qual o fago se liga através da proteína capsidial pIII para entrar na célula. A replicação do fago consiste em três fases, de acordo com mudanças no perfil da fita do DNA circular: fita simples para fita dupla (fs→fd), fita dupla para fita dupla (fd→fd) e fita dupla para fita simples (fd→fs). A primeira fase (fs→fd) é realizada inteiramente por enzimas no hospedeiro, em que a molécula de DNA de fita simples é

convertida para a forma replicativa de fita dupla, possibilitando a transcrição dos outros genes. Para a segunda e terceira fases (fd→fd e fd→fs, respectivamente), as proteínas codificadas pelo gene II (pII e pX) são necessárias para o início da síntese de DNA, o qual é replicado por um mecanismo de círculo rolante que é terminado pelas mesmas proteínas através da clivagem da fita + deslocada na região IG. Em um estágio tardio do ciclo de vida do fago, a proteína pV se liga à fita + recém-sintetizada, impedindo que esta seja convertida a DNA de fita dupla para ser empacotada em uma nova partícula viral. O empacotamento de novos fagos é iniciado quando a pV é substituída por pVIII e outras proteínas capsidiais à medida que a partícula viral é projetada da célula (Figura 5) (VIEIRA & MESSING, 1989).

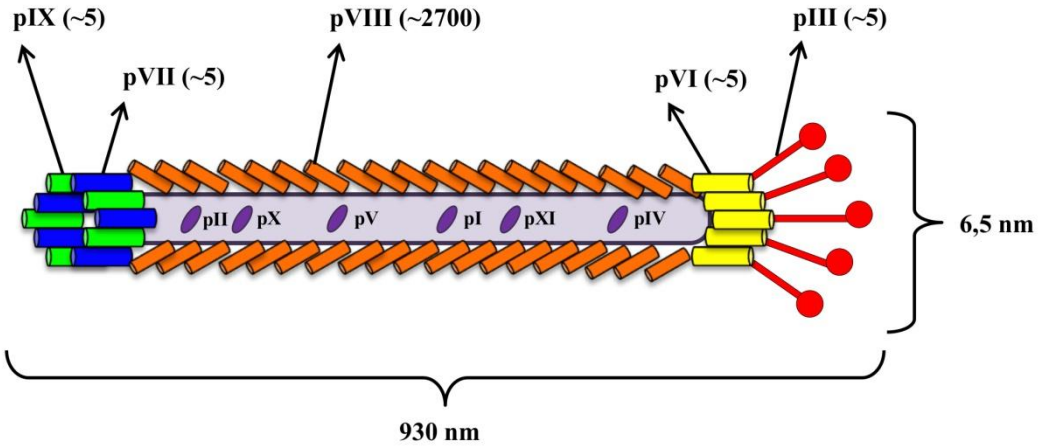


Figura 4. Características de fagos filamentosos da classe Ff. Esquema da estrutura dos fagos, destacando as dimensões, a localização das 11 proteínas codificadas pelo seu genoma e o número aproximado de moléculas para cada proteína capsidial, em parênteses. Figura adaptada de MULLEN *et al.*, 2006.

1.4.2. Fagomídeos e fagos auxiliares

Bibliotecas de *phage display* podem ser construídas a partir de moléculas híbridas de fago e vetores plasmidiais, os "fagomídeos", os quais são constituídos basicamente por uma origem de replicação do fago Ff, uma origem de replicação plasmidial em *E. coli*, um gene de proteína capsidial para a fusão com sequências externas, um sítio de clonagem múltipla e um

gene de resistência a um antibiótico (MULLEN *et al.*, 2006). Geralmente, os fagomídeos são derivados dos plasmídeos pUC18 e pUC19 e contêm a origem de replicação do fago M13 (M13IG) para a produção de DNA de fita simples (YANISCH-PERRON *et al.*, 1985).

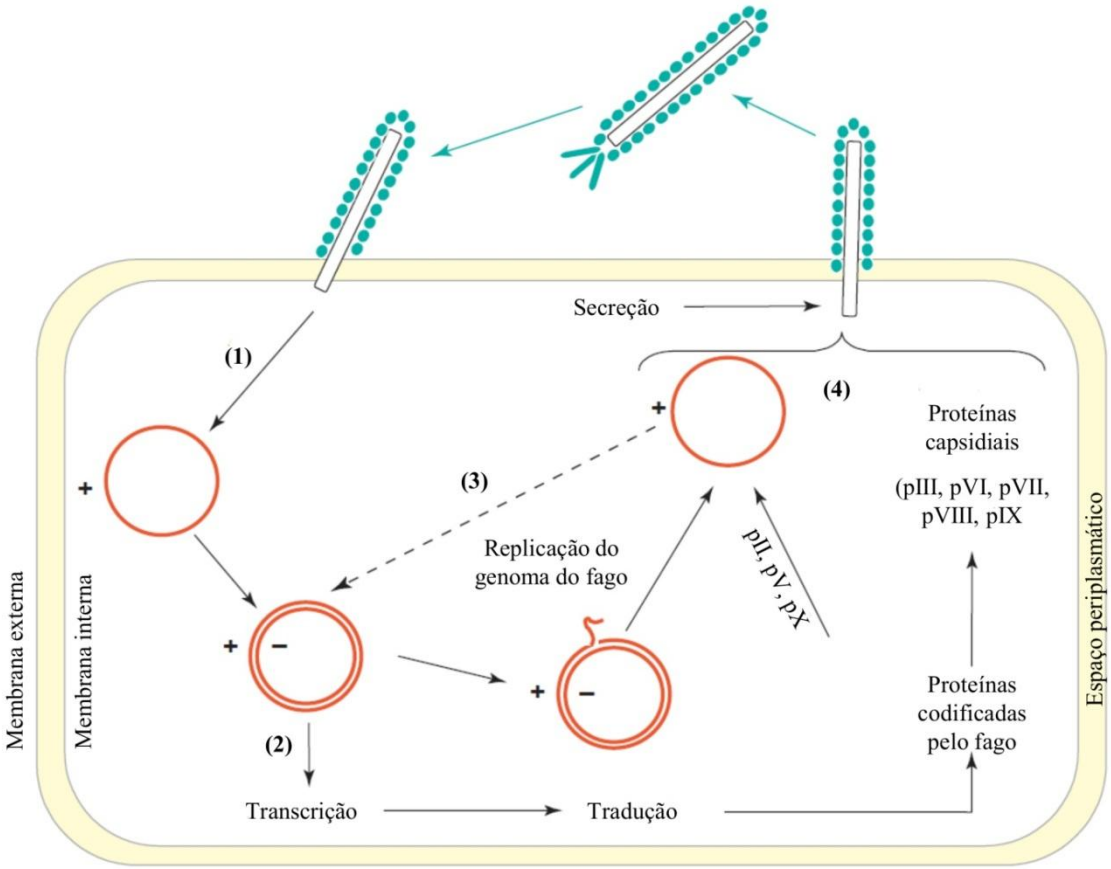


Figura 5. Ciclo de vida de fagos filamentosos em *E. coli*: (1) ligação do fago à bactéria através da proteína capsidial pIII; o genoma viral de fita simples (fita +) é injetado na célula e, em seguida, a fita complementar é sintetizada para formar o genoma de fita dupla (fitas + e -); (2) posteriormente, todas as proteínas codificadas pelo fago são sintetizadas a partir de enzimas do hospedeiro, incluindo as proteínas capsidiais (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX), proteínas para replicação (pII, pV e pX) e proteínas envolvidas na montagem e exportação dos fagos (pI, pIV e pXI); (3) O genoma viral é replicado a partir das fitas + e -; (4) Novas partículas virais são montadas e exportadas através das membranas bacterianas. Figura adaptada de MULLEN *et al.*, 2006.

Todas as cinco proteínas capsidiais dos fagos filamentosos foram utilizadas para a apresentação de peptídeos e proteínas, entretanto, pIII e pVIII são as proteínas capsidiais mais comumente empregadas para *phage display*. A pIII é mais tolerante a insertos maiores e seu papel no ciclo de vida do fago é uma característica vantajosa para a seleção de ligantes com

maior afinidade. Contudo, a pIII está presente em poucas cópias na superfície do fago e a infectividade do fago com pIII recombinante pode ser dramaticamente reduzida. A pVIII possui a vantagem de estar presente em múltiplas cópias na superfície do fago, porém, o alto número de moléculas de pVIII induz a seleção de ligantes com menor afinidade às moléculas receptoras escolhidas. Apesar de possuir uma limitação no tamanho das sequências para fusão à pVIII, a apresentação de polipeptídeos maiores em pVIII pode ser alcançada pela montagem de fagos híbridos, contendo pVIII recombinante fusionada e pVIII selvagem (CLACKSON & LOWMAN, 2004). Alguns dos fagomídeos para *phage display* descritos na literatura incluem moléculas com o gene da proteína III (pHEN1 e pG3H6) ou com o gene da proteína VIII (pG8H6 e pG8SAET) (JACOBSSON & FRYKBERG, 1995; NILSSON *et al.*, 1998; BECKMANN *et al.*, 2002; JACOBSSON *et al.*, 2003).

Fagomídeos não são capazes de formar um fago completo, mas podem ser cultivados em *E. coli* e empacotados como DNA de fagos Ff recombinantes com a ajuda de fagos auxiliares que fornecem todos os componentes necessários para a montagem do fago. Exemplos de fagos auxiliares incluem M13KO7 e VCSM13, os quais possuem todos os componentes do fago M13, com a inserção da origem de replicação p15A e do gene de resistência à canamicina na região IG. Com p15A, os fagos auxiliares conseguem se replicar independentemente das proteínas do gene II, pois a origem de replicação contida na região intergênica original do fago M13 é inativada. Entretanto, sua replicação é menos eficiente e, portanto, o DNA do fagomídeo é preferencialmente empacotado sobre seu próprio DNA nos fagos recombinantes (VIEIRA & MESSING, 1989).

1.4.3. Tipos de bibliotecas e seleção

As bibliotecas de *phage display* podem ser construídas com peptídeos randômicos sintéticos ou peptídeos naturais. Bibliotecas com peptídeos naturais são obtidas a partir de

DNA fragmentado aleatoriamente de organismos selecionados, como patógenos, e são importantes ferramentas para a identificação de componentes vacinais e de adesinas bacterianas (MULLEN *et al.*, 2006). A maioria dos clones em bibliotecas com peptídeos naturais não são funcionais, porque apenas 1 em 18 clones está inserido corretamente em fase com as sequências do vetor (1/3 dos clones começa corretamente, 1/3 dos clones termina corretamente e 1/2 dos clones estão na orientação correta). Entretanto, peptídeos ou proteínas selecionados a partir destas bibliotecas são em geral mais bem sucedidos em induzir uma resposta de anticorpos que apresentam reatividade cruzada com o patógeno intacto.

A inibição da adesão bacteriana é uma forma potencial de terapia contra doenças, mas geralmente requer conhecimento íntimo das adesinas envolvidas na infecção. Através da construção de bibliotecas a partir de fragmentos randômicos do DNA genômico bacteriano (isto é, *shotgun phage display*) e a subsequente seleção contra componentes do hospedeiro, como proteínas da matriz extracelular, soro ou plasma, é possível identificar genes que codificam adesinas celulares de superfície ou fatores de virulência (MULLEN *et al.*, 2006).

A seleção de bibliotecas de fagos, ou *biopanning*, pode ser realizada em superfícies celulares ou em proteínas da matriz extracelular imobilizadas. O *biopanning* em células apresenta limitações como a recuperação de clones não específicos e os repetidos ciclos de lavagem são trabalhosos, ineficientes e podem causar a perda tanto das células quanto de ligantes potenciais. A metodologia denominada BRASIL (*"Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands"*) permite a separação eficiente das células com fagos ligados dos demais fagos livres através de uma centrifugação diferencial (GIORDANO *et al.*, 2001). Os complexos células-fagos permanecem na fração precipitada, permitindo a posterior remoção e análise dos fagos ligantes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é a identificação e caracterização de novas adesinas codificadas por *Leptospira interrogans*, através da técnica de *shotgun phage display*.

2.2. Objetivos específicos

- Construir bibliotecas apresentada em fagos, a partir da técnica de *shotgun phage display*;
- Selecionar e identificar novas adesinas com capacidade de ligação à superfície de células de mamíferos e/ou componentes da matriz extracelular;
- Caracterizar as adesinas selecionadas e verificar sua atividade antigênica como possíveis candidatas vacinais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Organismos, condições de cultivo e vetores

Os sorovares da bactéria *Leptospira* empregados nos experimentos deste projeto foram obtidos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Universidade de São Paulo, Brasil), sendo a espécie *L. interrogans*, pertencente ao sorovar Copenhageni (cepa Fiocruz L1-130; *Taxonomy ID*: 267671), a mais utilizada (Tabela 2). A manutenção da virulência e as condições de cultivo foram realizadas segundo descrito por SILVA *et al*. (2012). Em resumo, o cultivo foi realizado em meio líquido EMJH (Ellinghausen McCullough Johnson & Harris), suplementado com BSA ("*Bovine Serum Albumin*") e sob condições de aerobiose em temperatura de 30°C. As bactérias utilizadas para extração do DNA genômico pertenciam à terceira passagem após serem isoladas de animais (SILVA *et al.*, 2012).

As cepas de bactérias *Escherichia coli* DH10B, XL1-Blue e TG1 competentes foram utilizadas para amplificação de fagos auxiliares e construção das bibliotecas. As células foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani; composto por 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl e 200 µl de NaOH 5 M para cada 1 L de meio) contendo os antibióticos adequados, em temperatura de 37°C e sob agitação. As cepas utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes foram: *E. coli* BL21 Star (DE3)-pLysS e *E. coli* Origami, cultivadas em meio LB contendo os antibióticos adequados, em temperatura de 37°C e sob agitação; *E. coli* BL21 SI, cultivada em meio LBON (meio LB sem NaCl) contendo os antibióticos adequados, em temperatura de 30°C e sob agitação.

Para os experimentos de *phage display*, foram utilizados os fagomídeos pG8SAET e pG8NHP (Figura 6), e o fago auxiliar M13KO7. As linhagens de células eucarióticas selecionadas para os *biopannings* foram as células LEC (células do endotélio microvascular de pulmão, originadas de camundongos H-2Kb-tsA58; LANGLEY *et al.*, 2003) e as células

Vero (células epiteliais de rim, originadas de macacos *Cercopithecus aethiops*). Finalmente, os vetores plasmidiais utilizados para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes foram o sistema pGEM®-T Easy Vector (Promega®) e pAE (RAMOS *et al.*, 2004), respectivamente.

Tabela 2

Cepas bacterianas, vetores plasmidiais, fagomídeos, fagos auxiliares e linhagens de células eucarióticas utilizados.

BACTÉRIAS	**Sorovares**
Leptospira biflexa	Patoc (cepa Patoc 1 'Paris')
Leptospira borgpetersenii	Castellonis (cepa Castellon 3)
Leptospira interrogans	Copenhageni (cepa Fiocruz L1-130) Pomona (cepa Kennewicki) Batavie (cepa Van Tienen) Icterohaemorrhagiae (cepa RGA)
Leptospira kirschneri	Grippotyphosa (cepa Moskva)
Leptospira noguchii	Panama (cepa CZ214)
	Cepas
Escherichia coli	DH10B, XL1-Blue, TG1, BL21 Star (DE3)-pLysS, BL21 SI e Origami
VETORES PLASMIDIAIS	pGEM®-T Easy vector
	pAE
FAGOMÍDEOS	pG8SAET
	pG8NHP
FAGOS AUXILIARES	M13KO7
CÉLULAS EUCARIÓTICAS	LEC
	Vero

3.2. Preparação de bactérias *E. coli* eletrocompetentes

Bactérias *E. coli* DH10B e TG1 eletrocompetentes foram preparadas segundo descrito na literatura (SAMBROOK & RUSSELL, 2001), com algumas modificações.

A partir de uma placa fresca contendo meio LB-ágar (meio LB acrescido de 15 g de bacto-ágar/L de meio), uma colônia isolada de *E. coli* foi coletada e inoculada em 25-100 ml de meio LB sem antibióticos (TG1) ou acrescido de 25 μg/ml de estreptomicina (DH10B) para incubação a 37°C por ~16 h, em um agitador orbital (200-250 rpm). Foram adicionados 3-5 ml da cultura inicial para cada 500 ml de meio LB+estreptomicina (DH10B) ou 2YT (composto por 16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl e 200 μl de NaOH 5 M para cada 1 L de meio; meio para TG1), e as novas culturas foram incubadas a 37°C sob agitação (200-250 rpm) até ser atingida uma densidade óptica (DO_{600nm}) de 0.5-0.6.

Após ser atingida a DO_{600nm} ideal, as culturas foram separadas em tubos de centrifugação (400 ml) e mantidas em gelo por 20 min. A partir deste passo, as bactérias foram sempre mantidas em gelo ou a 4°C. As culturas foram centrifugadas a 2068xg por 20 min, a 4°C (Sorvall® RC-26 Plus; rotor SLA-3000), e após o descarte do sobrenadante, o precipitado celular foi ressuspenso com água Milli-Q gelada. Os passos de incubação em gelo, centrifugação e ressuspensão em água Milli-Q ou glicerol 10% gelado foram repetidos por mais 2-3 vezes. O precipitado celular final foi ressuspenso em 1 ml de glicerol 10% gelado para cada 1 L de cultura e alíquotas de 50-100 μl foram imediatamente congeladas em gelo seco e armazenadas a -80°C.

Testes para a eficiência de transformação das bactérias eletrocompetentes foram realizados com amostras de DNA com concentrações conhecidas e a eletroporação foi feita a 2,5 kV, 200 Ω de resistência e 25 μF de capacitância (Bio-Rad® Gene Pulser II Electroporator). As culturas pulsadas foram recuperadas em meio SOC e diluídas para adição em placas LB-ágar com antibiótico adequado e, após incubação em estufa a 37°C por ~16 h, as colônias resultantes foram contadas e utilizadas para a determinação da eficiência de transformação. As bactérias *E. coli* DH10B resultaram em eficiência de aproximadamente 10^8

unidades formadoras de colônias (CFU)/µg de DNA, enquanto que as bactérias *E. coli* TG1 apresentaram eficiência de aproximadamente 10^9 CFU/µg DNA.

3.3. Extração de DNA genômico de *L. interrogans*

Culturas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Fiocruz L1-130) foram divididas em tubos de 50 ml e centrifugadas a 6.000 rpm por 20 min a 4°C (Sorvall® RC-26 Plus; rotor SLA-3000); após o descarte dos sobrenadantes, os precipitados celulares foram congelados a -80°C.

A extração do DNA genômico foi realizada com 3 ml de DNAzol® Reagent (Life Technologies®) para cada 25 ml de cultura. A homogeneização e a lise das células foram feitas através de passagens em seringa e agulha (0.80x25mm e 0.45x13mm) e todo o conteúdo foi reunido e centrifugado a 10.000xg por 10 min a 20°C (Eppendorf® Centrifuge 5810 R, rotor F-34-6-38). O sobrenadante foi transferido para novo tubo, ao qual foram adicionados 11,5 ml de álcool etílico absoluto gelado, e a solução foi então incubada a -20°C por ~16 h.

Após incubação, foram adicionados 100 µg de glicogênio à solução, a qual foi misturada e centrifugada a 10.000xg por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular resultante foi lavado com 10 ml de álcool etílico 75% gelado e submetido a uma nova centrifugação de 10.000xg por 15 min a 4°C. A lavagem com álcool etílico 75% foi repetida mais uma vez e o precipitado celular final foi ressuspenso em 100-150 µl de água Milli-Q. Devido à opacidade da amostra final, uma nova centrifugação foi realizada (16100xg por 15 min a 4°C; Eppendorf® Centrifuge 5415 R, rotor F45-24-11), em que se formaram duas fases: uma superior transparente e uma inferior opaca. Após análise das duas fases, observou-se que grande parte do DNA genômico estava na fase superior, a qual foi utilizada para a construção das bibliotecas.

3.4. Fragmentação do DNA genômico de *L. interrogans*

O DNA genômico de *L. interrogans* obtido foi submetido à fragmentação mecânica com o sonicador Branson Digital Sonifier® 250. As vantagens deste equipamento incluem a facilidade de manipulação e a variedade de tubos e volumes que podem ser utilizados para a fragmentação, entretanto, é necessário realizar a padronização de acordo com a amostra a ser fragmentada. A sonicação foi previamente padronizada a partir de amostras preparadas com 10 μg de DNA genômico em 500 μl de tampão Tris-EDTA (TE: 10mM Tris-HCl e 1 mM EDTA, pH 8,0), as quais foram fragmentadas durante 40-120 seg; para todas os tempos determinados, foram fixados pulsos de 20 seg, com intervalos de 20 seg, e amplitude de 60-70%. Após análise por eletroforese em gel de agarose, as amostras sonicadas por mais tempo (120 seg) apresentaram padrão mais próximo do ideal e novas amostras foram preparadas para sonicação com 10-36 μg de DNA genômico em 500-1000 μl de tampão TE.

Todas as amostras foram precipitadas com mesmo volume de álcool isopropílico, 10% de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e 20 μg de glicogênio. Após centrifugação (16100xg por 15 min a 4°C; Eppendorf® Centrifuge 5415 R, rotor F45-24-11), as amostras foram lavadas com álcool etílico 70% e ressuspensas em tampão TE. Depois da precipitação, as amostras foram reunidas para uma nova análise por eletroforese em gel de agarose, onde fragmentos entre 200-850 pb foram excisados e purificados do gel segundo o protocolo do kit QIAquick Gel Extraction (Spin Protocol - QIAGEN®).

3.5. Amplificação e purificação dos fagomídeos pG8SAET e pG8NHP

O fagomídeo pG8SAET (3395pb; GenBank: AF130864.1), descrito na literatura (JACOBSSON *et al.*, 2003), foi o principal vetor utilizado para a construção de bibliotecas de *L. interrogans*, o qual possui o gene que codifica a proteína capsidial pVIII, proteína com maior número de moléculas na superfície do fago (Figura 6). O vetor pG8SAET foi

modificado para a adição dos sítios de restrição HindIII e PstI através do sítio de restrição NcoI presente no vetor (Figura 6). O novo fagomídeo foi chamado de pG8NHP e foi utilizado principalmente para os testes de ligação com a utilização de adaptadores, com a finalidade de aumentar a eficiência na obtenção de clones.

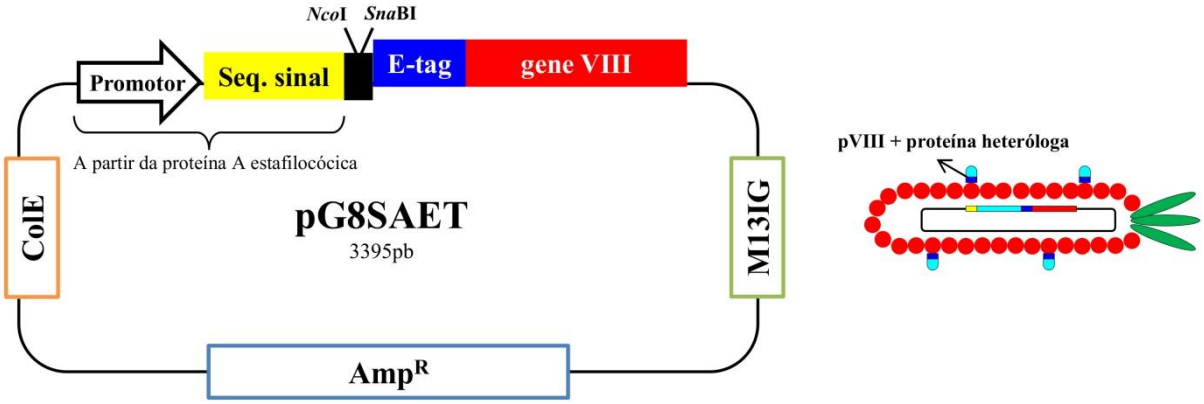


Figura 6. O fagomídeo pG8SAET é derivado do vetor pUC119 e foi o principal vetor utilizado para a construção das bibliotecas. *À esquerda*, o esquema do fagomídeo destaca a presença do promotor e sequência sinal da proteína A estafilocócica, seguidos por alguns sítios de restrição (representados por *Nco*I e *Sna*BI). Na sequência, encontra-se o marcador universal (*E-tag*) em fase com o gene que codifica a proteína capsidial pVIII de fago filamentoso (*gene VIII*), os quais estão fora de fase com a sequência sinal e, portanto, os insertos clonados devem ser de tamanho tal que deixe a sequência sinal e o gene para a pVIII em fase. O fagomídeo também contém uma origem de replicação em *E. coli* (*ColE*), uma origem de replicação do fago M13 (*M13IG*) e um gene para resistência ao antibiótico ampicilina (Amp^R). O fagomídeo pG8NHP, derivado de pG8SAET, possui a inserção dos sítios HindIII e PstI, através do sítio *NcoI*. *À direita* é apresentada uma partícula viral hipotética, apresentando pVIII selvagem (círculos vermelhos) e pVIII recombinante (pVIII + proteína heteróloga). Figura adaptada de JACOBSSON *et al.*, 2003.

Bactérias *E. coli* DH10B eletrocompetentes foram transformadas por eletroporação (2,5 kV, 200 Ω de resistência e 25 µF de capacitância; Bio-Rad® Gene Pulser II Electroporator) com 50-1000 ng dos fagomídeos, recuperadas em meio SOC e incubadas em placas LB-ágar (meio acrescido de 100 µg/ml de ampicilina [resistência presente no vetor pG8SAET] e 25 µg/ml de estreptomicina) a 37°C, por ~16 h. Após a incubação, uma colônia isolada foi adicionada a 5 ml de meio LB líquido estéril com ampicilina e estreptomicina e a cultura foi incubada a 37°C sob agitação (200-250 rpm), por ~16 h. Foram então adicionados

500 µl da cultura a cada 500 ml de meio LB líquido estéril (com ampicilina e estreptomicina) e a cultura foi novamente incubada a 37°C sob agitação, por ~16 h. A cultura resultante foi separada e centrifugada a 6.000 rpm por 20 min a 4°C (Sorvall® RC-26 Plus; rotor SLA-3000), e o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi armazenado a -20°C.

A extração e purificação de DNA dos fagomídeos foram realizadas segundo o protocolo do kit QIAfilter Plasmid Purification Maxi (QIAGEN®). A integridade dos vetores amplificados e purificados foi avaliada através de reações de digestão com enzimas de restrição, e posterior análise das amostras digeridas por eletroforese em gel de agarose.

3.6. Preparação e padronização de amostras para ligação com extremidades cegas (*blunt-end*)

A técnica de ligação com extremidades cegas (ligação *blunt-end*) foi a principal ferramenta utilizada para a construção de bibliotecas genômicas neste projeto, baseada na ligação entre fragmentos de DNA genômico de *L. interrogans* e o vetor pG8SAET digerido pela enzima de restrição SnaBI, a qual resulta em extremidades cegas (Figura 7).

Para a ligação *blunt-end*, o vetor pG8SAET e os fragmentos de DNA genômico de *L. interrogans* necessitaram ser submetidos a alguns tratamentos específicos. O vetor pG8SAET foi digerido com a enzima SnaBI (New England BioLabs®) e, em seguida, o vetor foi defosforilado com fosfatase alcalina (SAP, Fermentas®). A digestão foi realizada com 2 U de SnaBI/µg DNA a 37°C por ~16 h, e a defosforilação foi realizada com 0.1 U de SAP/µg DNA a 37°C por 1 h; ambas as enzimas utilizadas foram inativadas por calor após cada reação (80°C por 20 min para a SnaBI e 65°C por 10 min para a SAP). Após os tratamentos, o vetor foi analisado por eletroforese em gel de agarose e selecionado para a extração e purificação do gel, segundo o protocolo do kit QIAquick Gel Extraction (Spin Protocol - QIAGEN®).

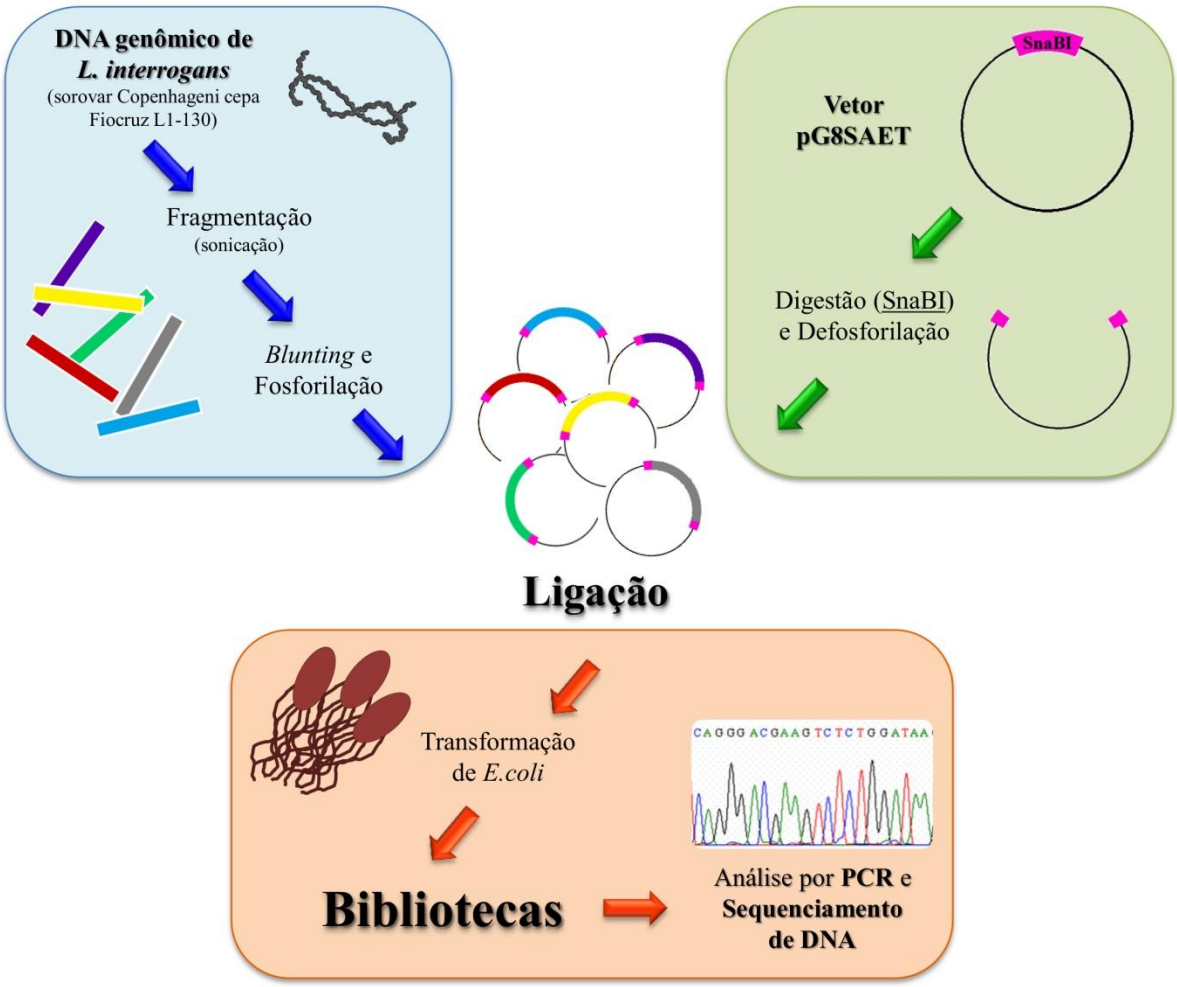


Figura 7. Esquema resumido da construção, análise e validação de bibliotecas genômicas de *L. interrogans*, através de ligação das extremidades cegas (ligação *blunt-end*) com o vetor pG8SAET. As padronizações foram focadas principalmente na preparação do vetor pG8SAET e nos parâmetros utilizados para a ligação, como a relação molar vetor:inserto, quantidade de T4 DNA ligase e presença de PEG.

Por outro lado, os fragmentos de DNA genômico de *L. interrogans* previamente preparados foram submetidos à reação de *blunting* com a enzima T4 DNA polimerase (Thermo Scientific®), a qual deixa os fragmentos com extremidades cegas e, em seguida, os fragmentos foram submetidos à reação de fosforilação com a enzima T4 Polinucleotídeo quinase (PNK, Thermo Scientific®). A reação de *blunting* foi realizada com 3-5 U da enzima/µg DNA a 11°C por 20 min, e a reação de fosforilação foi realizada com 1-5 U de PNK/µg DNA a 37°C por 20 min; ambas as enzimas utilizadas foram inativadas por calor

após cada reação (75°C por 10 min). Após os tratamentos, os fragmentos foram também analisados por eletroforese em gel de agarose e selecionados para a extração e purificação do gel, segundo o protocolo do kit QIAquick Gel Extraction (Spin Protocol - QIAGEN®).

Além do vetor e fragmentos tratados, as reações de ligação continham a T4 DNA ligase (New England BioLabs® ou Thermo Scientific®) com seu respectivo tampão, e algumas reações também continham polietilenoglicol (PEG 4000 50%, Thermo Scientific®). Reações controle com o vetor digerido sem insertos, na ausência ou presença de T4 DNA ligase (denominadas Vetor Digerido [VD] e Vetor Digerido+Ligase [VDL], respectivamente) também foram preparadas. As reações de ligação foram geralmente realizadas a 16°C, por ~16 h, exceto pelas reações contendo PEG, as quais foram realizadas a 16°C por 1 h e posteriormente purificadas por coluna, segundo o protocolo do kit QIAquick Gel Extraction (Spin Protocol - QIAGEN®).

Para as padronizações, os parâmetros testados incluíram principalmente o número de reações de digestão e defosforilação do fagomídeo pG8SAET e os outros parâmetros testados foram a razão molar da relação vetor:inserto (realizados a partir de 200-250 ng do vetor pG8SAET), a quantidade de T4 DNA ligase e a presença ou ausência de PEG. A Tabela 3 apresenta os detalhes dos testes realizados.

Tabela 3

Relação dos parâmetros avaliados e alterados para a padronização da técnica de ligação *blunt-end* e construção de bibliotecas.

Parâmetros avaliados	**Padronizações**	
	1	**2**
Tratamento do vetor pG8SAET		
Número de digestões	1 reação	2 reações
Número de defosforilações	2 reações	2 reações
Razão molar (relação vetor:inserto)	1:1, 1:3 e 1:6	1:5
Quantidade de T4 DNA Ligase	3200 U/µg vetor	2400 U/µg vetor
Presença de PEG 4000	Não	Sim

Após as reações de ligação, as amostras foram precipitadas com álcool etílico absoluto 2,5 vezes, 10% de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e 20 μg de glicogênio. Após centrifugação (16100xg por 15 min a 4°C; Eppendorf® Centrifuge 5415 R, rotor F45-24-11), as amostras foram lavadas com álcool etílico 70% e finalmente ressuspensas em água Milli-Q. Posteriormente, as amostras foram adicionadas a alíquotas (50 μl) de bactérias *E. coli* DH10B ou TG1 eletrocompetentes para a transformação por eletroporação (2,5 kV, 200 Ω de resistência e 25 μF de capacitância; Bio-Rad® Gene Pulser II Electroporator) e a posterior contagem de colônias resultantes em placas LB-ágar (com 100 μg/ml de ampicilina), incubadas a 37°C por ~16 h. Algumas colônias foram avaliadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) para a verificação da inserção dos fragmentos nos vetores. As reações foram realizadas segundo o protocolo da enzima Taq polimerase (Life Technologies®), com a adição de um par de oligonucleotídeos específicos para o vetor pG8SAET (Tabela 4) e uma porção das colônias selecionadas separadamente. A programação dos ciclos de PCR consistia em: 95°C/3 min, 35x (95°C/30 seg, 58°C/30 seg e 72°C/1 min) e 72°C/7 min. Em seguida, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

3.7. Preparação e padronização de amostras para ligação com extremidades coesivas (técnicas alternativas)

Devido às limitações apresentadas pela técnica de ligação *blunt-end* para a construção de bibliotecas genômicas, foram testadas técnicas alternativas baseadas na estratégia de ligação com extremidades coesivas, característica que geralmente aumenta a eficiência das reações de ligação. As técnicas alternativas incluem a obtenção de ORESTES (*"Open Reading frame Expressed Sequence Tags"*) e a utilização de adaptadores para a ligação. As técnicas examinadas foram realizadas em colaboração com o aluno de doutorado André A. R. Teixeira e parte dos experimentos foram realizados no laboratório de Biologia Vascular

(Instituto de Química - USP). O vetor pG8SAET modificado, pG8NHP, foi produzido pelo aluno André A. R. Teixeira, e o novo fagomídeo foi utilizado principalmente para os testes de ligação com a utilização de adaptadores (item 3.7.2. desta seção).

3.7.1. Padronização da obtenção de ORESTES

A obtenção de ORESTES é uma estratégia interessante, pois permite a amplificação de fragmentos de DNA genômico sem que haja seleção ou enriquecimento de porções específicas do genoma, principalmente as regiões repetitivas. Desta forma, a probabilidade de que todas as regiões do genoma estejam representadas igualmente é aumentada, garantindo a construção de bibliotecas de melhor qualidade. A técnica original foi realizada para a obtenção de RNA mensageiros (DIAS-NETO et al., 2000) e, portanto, adaptações foram adotadas a fim de obter os mesmos resultados para DNA genômico (Figura 8A).

Padronizações foram realizadas com o DNA genômico extraído de parasitas *Trypanossoma cruzi* (objeto de estudo do aluno de doutorado André A. R. Teixeira) para posterior aplicação ao DNA genômico de *L. interrogans*. Para as amplificações por PCR, foi gerado um conjunto de oligonucleotídeos randômicos com as seguintes características: conteúdo de GC entre 40% e 60% e composição de 3 nucleotídeos aleatórios (nt), seguidos pelo sítio de restrição da enzima HindIII (AAGCTT) e mais 11 nt. Neste conjunto, foi evitada a presença de códons de parada e das últimas 2 bases serem TA, bases que poderiam aumentar as chances de formação de códons de parada precoces (TAA e TAG) (Figura 8B). Nos testes, foram também analisados parâmetros como a quantidade de Taq polimerase, a concentração de $MgCl_2$ e a temperatura de pareamento ("*annealing temperature*"), sendo estabelecidos: 5 U da enzima Taq polimerase, 5 mM de $MgCl_2$ e 25°C como temperatura de pareamento nos ciclos de PCR. Finalmente, os parâmetros estabelecidos foram testados com dois ciclos diferentes de PCR: a PCR 1 com 35 ciclos compostos por desnaturação, pareamento e

extensão, e a PCR 2 com 35 ciclos compostos apenas por desnaturação e pareamento, a fim de reduzir o tamanho médio dos produtos amplificados resultantes (Figura 8C).

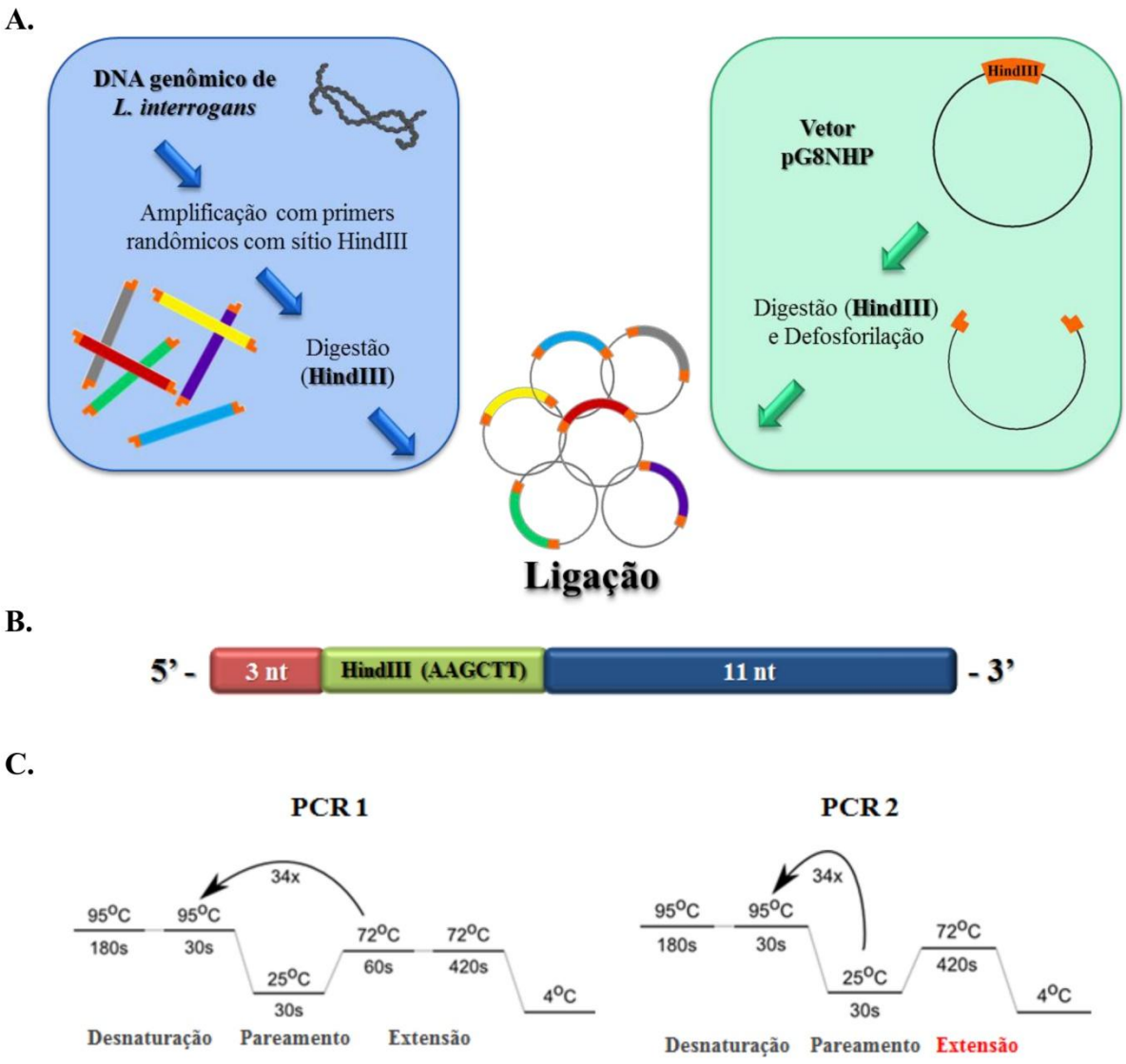


Figura 8. Padronização da obtenção de ORESTES. **A.** Esquema resumido da ligação através de extremidades coesivas entre fragmentos de DNA genômico obtidos como ORESTES (*Open Reading frame Expressed Sequence Tags*) e o vetor pG8NHP tratado. As padronizações para a obtenção de ORESTES foram focadas em parâmetros como a quantidade de Taq polimerase e de DNA, concentração de $MgCl_2$, temperatura de pareamento na PCR e ciclos da PCR. **B.** Representação do conjunto de oligonucleotídeos selecionados para a obtenção de ORESTES, compostos por 3 nucleotídeos aleatórios (nt), um sítio de restrição da enzima HindIII (AAGCTT) e mais 11 nt. **C.** Esquemas dos ciclos de PCR utilizados, em que a PCR 1 possui os passos de desnaturação, pareamento e extensão dentro dos 35 ciclos de amplificação, enquanto que a PCR 2 possui apenas os passos de desnaturação e pareamento dentro dos ciclos. A extensão destacada na PCR 2 corresponde à extensão única final, também presente na PCR 1.

3.7.2. Ligação com a utilização de adaptadores

A técnica de ligação utilizando adaptadores difere da ligação *blunt-end* pela adição de adaptadores nas extremidades de fragmentos de DNA genômico; tais adaptadores possuem um sítio de restrição em sua sequência, permitindo a posterior digestão e inserção no vetor. A enzima de restrição utilizada produz extremidades coesivas, o que aumenta a especificidade da ligação (Figura 9A).

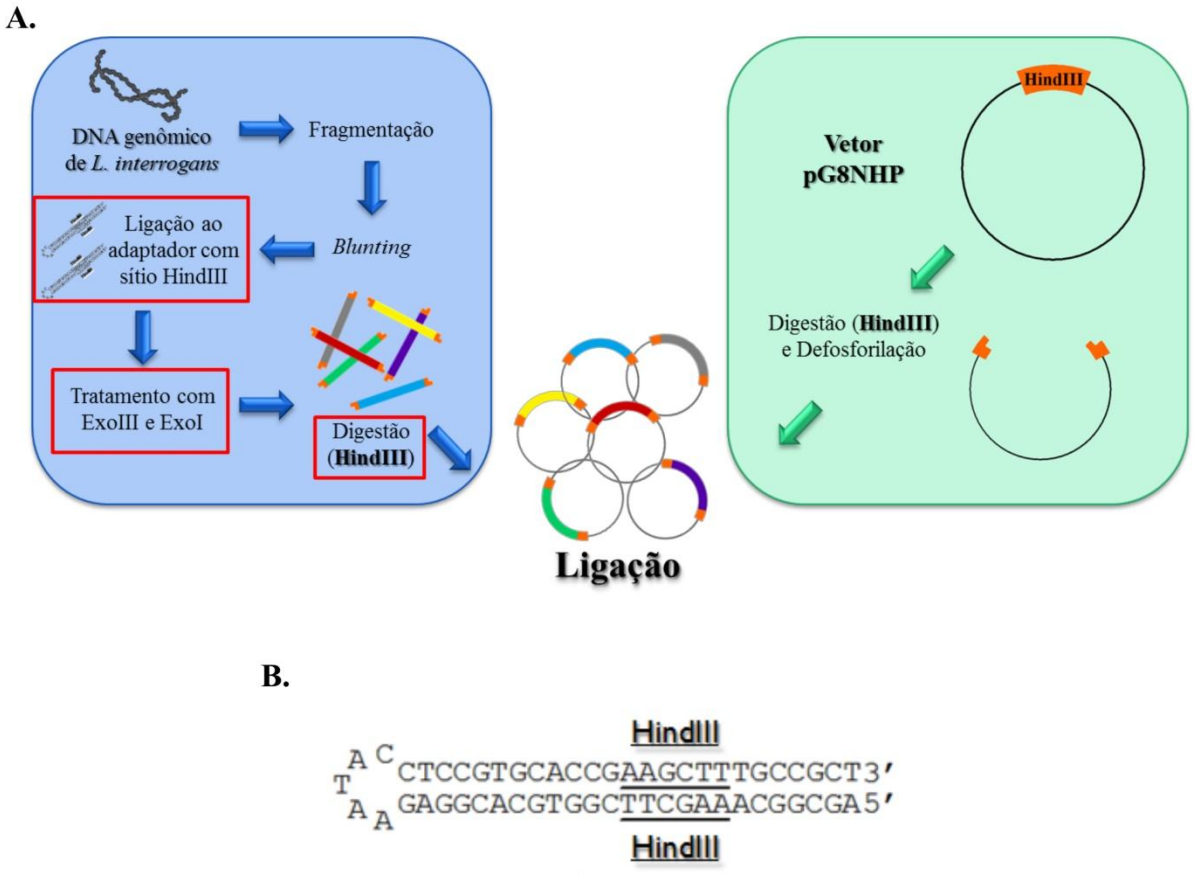


Figura 9. Padronização da ligação com adaptadores. **A.** Esquema resumido da ligação através de extremidades coesivas a partir de fragmentos de DNA genômico submetidos a reações de *blunting*, ligação ao adaptador com sítio HindIII, tratamentos com as enzimas ExoIII e ExoI e digestão com HindIII; a ligação foi realizada com o vetor pG8NHP tratado. As padronizações foram focadas principalmente na relação molar vetor:inserto utilizada nas reações de ligação. **B.** Esquema do adaptador em grampo ("*hairpin-linker*") utilizado para ligação aos fragmentos de DNA genômico de *L. interrogans*, portando o sítio de restrição da enzima HindIII.

Os adaptadores utilizados possuem conformação em grampo ("*hairpin-linkers*") e um sítio de restrição da enzima HindIII (Figura 9B), permitindo a ligação no vetor modificado pG8NHP. Para a ligação utilizando os adaptadores, o vetor pG8NHP e os fragmentos de DNA genômico de *L. interrogans* foram submetidos a tratamentos semelhantes aos realizados para a ligação *blunt-end*. As principais diferenças encontram-se nos tratamentos adicionais dos fragmentos, além da digestão do vetor com a enzima HindIII.

O vetor pG8NHP foi digerido com a enzima HindIII (*FastDigest* HindIII, Thermo Scientific®) e defosforilado com fosfatase alcalina (SAP, Fermentas®). Cada reação foi realizada duas vezes, sendo utilizados 0.7 FDU (unidades de enzima FastDigest) de HindIII/µg DNA para sucessivas digestões a 37°C por 16 h e 2 h, e 0.1 U de SAP/µg DNA para as defosforilações a 37°C por 1h; ambas as enzimas utilizadas foram inativadas por calor após cada reação (80°C por 20min para a HindIII e 65°C por 10min para a SAP). Após os tratamentos, o vetor foi analisado por eletroforese em gel de agarose e selecionado para a extração e purificação do gel, segundo o protocolo do kit QIAquick Gel Extraction (Spin Protocol - QIAGEN®).

Inicialmente, os fragmentos de DNA genômico de *L. interrogans* foram submetidos a reações de *blunting* e fosforilação da mesma forma que para a ligação *blunt-end* (ver item 3.6 desta seção). Após seleção e extração do gel de agarose, os fragmentos foram submetidos a tratamentos adicionais, incluindo a ligação com os adaptadores, os tratamentos com as enzimas exonuclease III e I, e a digestão com a enzima HindIII. A ligação com os adaptadores foi realizada com a razão molar de 5:1 na relação adaptador:inserto, com 85 U da enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific®) por µg de DNA e seu tampão correspondente; a reação foi feita a 16°C por ~16 h, seguida pela inativação da enzima a 65°C por 10 min. O tratamento com a exonuclease III (Exo III, New England BioLabs®) foi realizado com a adição de 100 U da enzima, acompanhada pelo tampão correspondente, a 37°C por 30 min. Este passo digere

fragmentos não ligados aos adaptadores a partir da extremidade 3', sem danificar os fragmentos ligados, os quais são protegidos pela forma em grampo dos adaptadores. Após inativação da enzima a 70°C por 20 min, a amostra foi tratada com 10 U da enzima exonuclease I (Exo I, Thermo Scientific®) e seu tampão correspondente, a 37°C por 30 min. Este passo digere fragmentos simples fita deixados pela digestão com a exonuclease III. A inativação da enzima exonuclease I necessitou da adição de 8 mM EDTA e incubação a 95°C por 10 min; após a inativação, a amostra foi purificada por coluna, segundo o protocolo do kit QIAquick Gel Extraction (Spin Protocol - QIAGEN®). Finalmente, a amostra com fragmentos ligados aos adaptadores foi submetida à digestão com 2 FDU da enzima HindIII (FastDigest HindIII, Thermo Scientific®) a 37°C por ~16 h, seguida por inativação a 80°C por 20 min. Após os tratamentos, os fragmentos digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose e selecionados para a extração e purificação do gel, segundo o protocolo do kit QIAquick Gel Extraction (Spin Protocol - QIAGEN®).

Para a padronização da técnica, foram testadas as razões molares de 1:1, 1:3 e 1:6 na relação vetor:inserto com adaptador, a partir de 250 ng de vetor pG8NHP. Além do vetor e fragmentos tratados, as reações de ligação continham 600 U (2400 U/μg vetor) da enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific®) e seu tampão correspondente. Reações controle com o vetor digerido sem insertos, na ausência ou presença de T4 DNA ligase (denominadas VD e VDL, respectivamente) também foram preparadas. As ligações foram feitas a 16°C por ~16 h, seguida por inativação da enzima a 65°C por 10 min. Para a comparação de resultados, foram realizadas reações de ligação *blunt-end* em paralelo, com razões molares 1:1 e 1:6, além dos controles respectivos.

Após as reações de ligação, as amostras foram precipitadas e em seguida adicionadas a alíquotas (50 μl) de bactérias *E. coli* TG1 eletrocompetentes para a transformação por eletroporação (2,5 kV, 200 Ω de resistência e 25 μF de capacitância; Bio-Rad® Gene Pulser

II Electroporator) e a posterior contagem de colônias resultantes em placas LB-ágar (com 100 μg/ml de ampicilina), incubadas a 37°C por ~16 h. Algumas colônias foram avaliadas por PCR para a verificação da inserção dos fragmentos nos vetores. As reações foram realizadas segundo o protocolo da enzima Taq polimerase (Life Technologies®), com a adição de um par de oligonucleotídeos específicos para o vetor pG8NHP (os mesmos utilizados para o vetor pG8SAET; Tabela 4) e uma porção das colônias selecionadas separadamente. Em seguida, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

3.8. Construção e validação das bibliotecas BBT1, BBT2 e BBT3

Apesar de algumas limitações ainda serem encontradas, a técnica de ligação *blunt-end* foi escolhida para a construção de bibliotecas em maior escala devido ao desempenho das padronizações. Ao total foram construídas três bibliotecas, denominadas BBT1, BBT2 e BBT3.

3.8.1. Construção da Biblioteca 1 (BBT1)

Para a construção da primeira biblioteca (BBT1), o vetor pG8SAET foi tratado com duas digestões pela enzima SnaBI (2 U/μg DNA, New England BioLabs®) e duas defosforilações com a enzima SAP (0,1 U/μg DNA, Fermentas®). Após o tratamento, foram utilizados 7,5 μg do vetor e 5,4 μg de fragmentos de DNA genômico de *L. interrogans* tratados para a ligação, seguindo a relação vetor:inserto de 1:6. A quantidade de T4 DNA ligase (New England BioLabs®) utilizada na reação foi de 2400 U/μg de vetor, com o tampão correspondente e na ausência de PEG; a reação foi submetida à incubação a 16°C por ~16 h, seguida pela inativação da enzima a 65°C por 10 min. A amostra resultante possuía 450 μl de volume total e a adição de sal equivalente para a precipitação (10% acetato de sódio 3 M [pH 5,2] e 200 μg de glicogênio) resultou em excesso de sal, mesmo após a lavagem com álcool

etílico 70%. Por esta razão, lavagens adicionais foram realizadas, o que pode ter implicado em perda de amostra durante o processo. Todo o conteúdo da amostra foi adicionado a 200 µl de bactérias *E. coli* DH10B eletrocompetentes para a transformação por eletroporação (2,5 kV, 200 Ω de resistência e 25 µF de capacitância; Bio-Rad® Gene Pulser II Electroporator). Após a recuperação em 2 ml de meio SOC, a cultura foi incubada a 37°C sob agitação (250 rpm) durante 40-60 min, e em seguida, uma alíquota foi separada e diluída a 10^{-3} para a análise da eficiência de transformação em placas LB-ágar com ampicilina e estreptomicina (100 µg/ml e 25 µg/ml, respectivamente), as quais foram incubadas a 37°C por ~16 h. O restante da cultura foi adicionado a 250 ml de LB líquido estéril, acrescido de ampicilina e estreptomicina, e incubado a 37°C sob agitação, por ~16 h. A cultura foi posteriormente centrifugada a 6.000 rpm por 20 min a 4°C (Sorvall® RC-26 Plus; rotor SLA-3000); o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi submetido a extração e purificação de DNA, segundo o protocolo do kit QIAfilter Plasmid Purification Maxi (QIAGEN®).

3.8.2. Construção das Bibliotecas 2 e 3 (BBT2 e BBT3)

As outras duas bibliotecas (BBT2 e BBT3) foram construídas em paralelo. Assim como para a BBT1, o vetor pG8SAET foi digerido e defosforilado duas vezes, mas foram utilizados 0,5 U/µg DNA da enzima SAP (Fermentas®) para as defosforilações, a fim de reduzir os vetores vazios depois da ligação. Após o tratamento, foram utilizados 10 µg do vetor para cada biblioteca e, em ambas as reações de ligação, foram utilizadas 2430 U/µg de vetor da enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific®) com seu tampão correspondente. As duas reações totais foram divididas em porções com 500 ng de vetor, a fim de aperfeiçoar cada ligação separadamente e diminuir possíveis interferências.

A BBT2 seguiu a relação vetor:inserto de 1:6 e, portanto, foram adicionados 7,07 µg de fragmentos de DNA genômico de *L. interrogans* tratados para a ligação, a qual ocorreu na

ausência de PEG. A ligação foi feita a 16°C por ~16 h, seguida pela inativação da enzima a 65°C por 10 min e pela reunião das porções de ligação. Por outro lado, a BBT3 seguiu a relação vetor:inserto de 1:3 e, portanto, foram adicionados 3,6 μg dos fragmentos tratados para a ligação, a qual ocorreu com a adição de 10% PEG (PEG 4000 50%, Thermo Scientific®). Devido à presença de PEG, a ligação foi feita a 16°C por 1 h, seguida pela reunião das porções para a purificação em coluna segundo o protocolo do kit QIAquick Gel Extraction (Spin Protocol - QIAGEN®).

As amostras resultantes foram precipitadas e, durante a precipitação da amostra com a BBT2, ocorreu o mesmo problema de excesso de sal que com a BBT1 e, portanto, pode ter implicado em perda de amostra durante o processo. Todo o conteúdo de cada amostra foi adicionado a 200 μl de bactérias *E. coli* TG1 eletrocompetentes para a transformação por eletroporação (2,5 kV, 200 Ω de resistência e 25 μF de capacitância; Bio-Rad® Gene Pulser II Electroporator). Após a recuperação em 2 ml de meio SOC, cada cultura foi incubada a 37°C sob agitação (250 rpm) durante 50 min, e em seguida, uma alíquota de cada foi separada e diluída a 10^{-6} para a análise da eficiência de transformação em placas LB-ágar com ampicilina (100 μg/ml), as quais foram incubadas a 37°C por ~16 h. O restante de cada cultura foi adicionado a 1 L de LB líquido estéril, acrescido de ampicilina, e incubado a 37°C sob agitação, por ~16 h. As culturas foram posteriormente centrifugadas a 6.000 rpm por 20 min a 4°C (Sorvall® RC-26 Plus; rotor SLA-3000); os sobrenadantes foram descartados e os precipitados celulares foram submetidos a extração e purificação de DNA, segundo o protocolo do kit QIAfilter Plasmid Purification Maxi (QIAGEN®).

A partir das placas de LB-ágar obtidas para a análise da eficiência de transformação, todas as bibliotecas tiveram algumas de suas colônias analisadas por PCR, as quais foram posteriormente validadas por sequenciamento. Para o sequenciamento, as culturas das

amostras consideradas positivas pela PCR de colônias foram amplificadas e seu DNA foi extraído e purificado, segundo o protocolo do kit illustra plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare Life Sciences®). Em seguida, a reação de amplificação foi preparada com 150 ng de DNA, 1,6 pmol do oligonucleotídeo específico para o vetor pG8SAET (*forward* ou *reverse*; Tabela 4) e com BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Life Technologies®). Após precipitação das amostras, as amplificações foram analisadas pelo sequenciador ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems®).

3.9. Amplificação, precipitação e titulação do fago auxiliar M13KO7

O fago auxiliar M13KO7 foi amplificado e titulado, a fim de possibilitar a montagem dos fagos recombinantes apresentando fragmentos de DNA genômico obtidos durante a construção das bibliotecas para o posterior *biopanning* em células eucarióticas (ver item 3.11 desta seção) (BARBAS *et al.*, 2001).

Uma colônia isolada a partir de uma placa LB-ágar fresca com bactérias *E. coli* XL1 Blue ou TG1 foi adicionada a 10 ml de meio líquido TB (Terrific Broth, composto por 12 g de triptona, 24 g de extrato de levedura e 4 ml de glicerol para cada 900 ml de meio) com 10% de solução fosfato (2,31 g de KH_2PO_4 e 12,54 g de K_2HPO_4 para cada 100 ml) e antibióticos adequados para a incubação a 37°C sob agitação (250 rpm), durante ~5h para atingir a DO_{600nm} de 0,3. Foram separados 2 ml da cultura em tubos com 1 ml cada, aos quais foram adicionadas 0,25-0,3 µl do fago auxiliar M13KO7 ($2,4x10^{14}$ unidades formadoras de placa [PFU]/ml) e, portanto, foram adicionados ~$6,6x10^{10}$ PFU, valor que estabelece a proporção de 20 fagos:1 bactéria (DO_{600nm} 0,3 ≈ $3x10^9$ células). Para a infecção, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente (T.A.) por 30 min e, em seguida, cada 1 ml de bactérias infectadas foi adicionado a 500 ml de meio líquido LB estéril acrescido de 50 µg/ml de canamicina (o fago auxiliar M13KO7 possui resistência a este antibiótico). As culturas

foram então incubadas a 37°C sob agitação durante ~8h. Após a incubação, as culturas estavam turvas, indicando que a infecção das bactérias pelo fago auxiliar foi eficiente.

Para a precipitação dos fagos, as culturas foram separadas e centrifugadas a 6.000 rpm por 20 min a 4°C (Sorvall® RC-26 Plus; rotor SLA-3000). Os precipitados celulares foram descartados e o sobrenadante resultante foi transferido para novos tubos, aos quais foram adicionados 15% do volume de PEG+NaCl (20% PEG 8000 e 2,5 M NaCl). A solução com os fagos foi então incubada a 4°C, por ~16 h. Após a incubação, a solução com fagos foi centrifugada a 6.000 rpm por 20 min a 4°C; o sobrenadante foi descartado e foi realizada uma centrifugação adicional por 3 min, para concentrar o precipitado em uma área menor. A ressuspensão foi feita com 900 µl de tampão PBS (*Phosphate-buffered Saline*, composto por 1,37 mM de NaCl, 27 mM KCl, 80mM Na_2HPO_4 e 20mM KH_2PO_4) para cada 500 ml de cultura, e a solução foi centrifugada novamente a 16100xg por 5 min a T.A. (Eppendorf® Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-11), a fim de separar possíveis fragmentos bacterianos ainda presentes na solução. O sobrenadante foi coletado e filtrado (filtro de 0,22 µm) e a solução de fagos final foi armazenada a 4°C.

A titulação dos fagos resultantes iniciou-se com a preparação de uma cultura de bactérias *E. coli* XL1 Blue ou TG1 em meio TB+fosfato. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação até ser atingida uma DO_{600nm} de 0,5 e, durante a incubação, alíquotas com 3 ml de meio LB-top ágar líquido (meio LB acrescido de 7 g de bacto-ágar/L de meio) foram preparadas e mantidas em banho a 55°C. Após a incubação da cultura, 2 µl das soluções de fagos precipitadas foram adicionados a 1 ml de PBS e, em seguida, os fagos foram diluídos como detalhado na Figura 10, antes de serem adicionados a 200 µl da cultura de bactérias. As três diluições dos fagos resultantes foram incubadas por 30 min a T.A. para a infecção e, durante os 5-10 min finais da incubação, as alíquotas com LB top ágar foram transferidas para o banho a 42°C. Após a incubação, foram adicionados 50 µl de cada diluição em 3 alíquotas

com LB top ágar aquecido, as quais foram imediatamente despejadas em placas com meio LB-ágar sem antibiótico; após o esfriamento das placas, elas foram incubadas a 37°C, por ~16 h. A contagem de PFU foi realizada e as amostras de fagos tituladas apresentaram entre $1,4x10^9$ e $1,4x10^{10}$ PFU/µl.

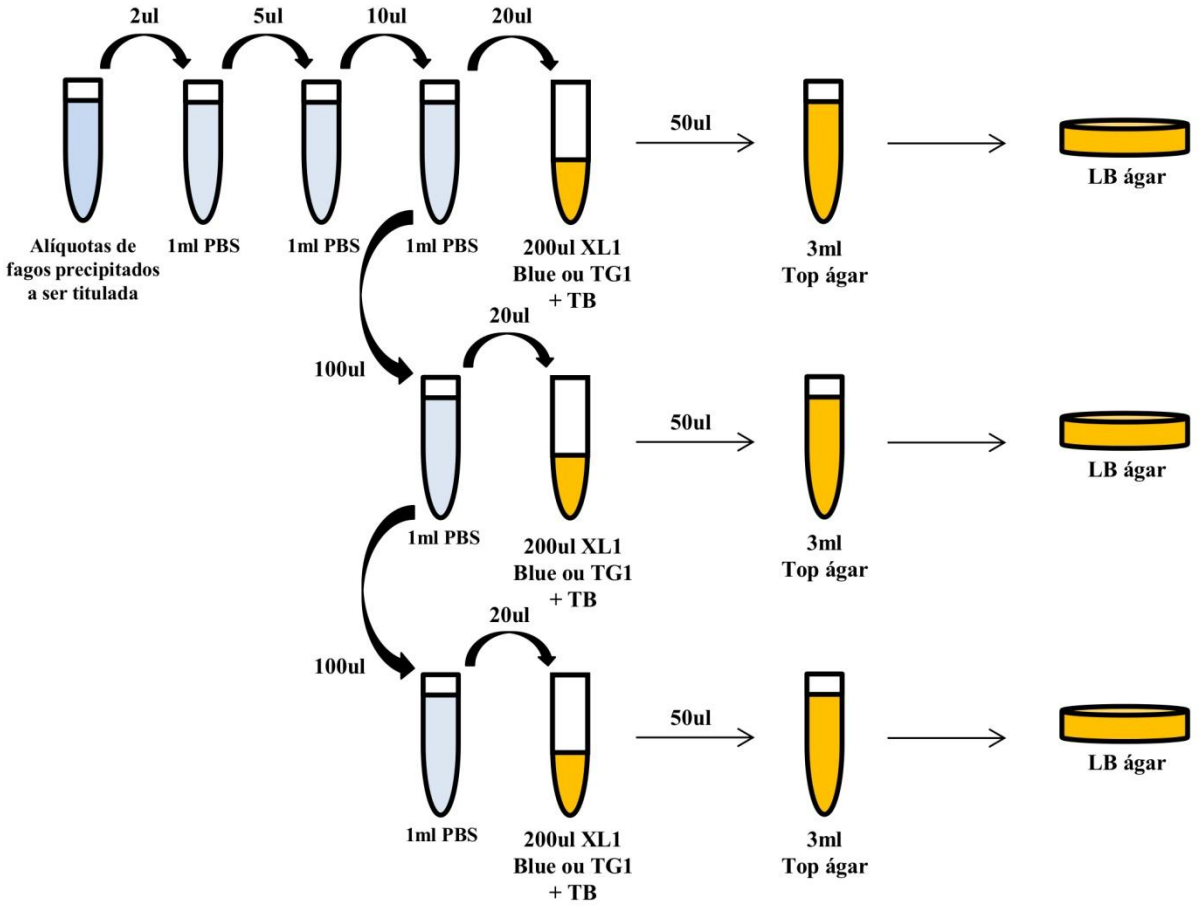


Figura 10. Esquema das diluições de amostras de fago precipitadas para titulação. A diluição foi inicialmente feita em tampão PBS e posteriormente os fagos diluídos foram adicionados a culturas de bactérias XL1 Blue ou TG1 para a infecção. Após incubação, alíquotas das infecções foram adicionadas ao top ágar e imediatamente despejadas em placas LB-ágar sem antibióticos.

3.10. Cultura de células eucarióticas

As linhagens de células utilizadas para o *biopanning* das bibliotecas construídas foram as células LEC (células do endotélio microvascular de pulmão, originadas de camundongos H-2K^b-tsA58; LANGLEY *et al.*, 2003) e as células Vero (células epiteliais de rim, originadas

de macacos *Cercopithecus aethiops*), as quais representam os principais órgãos afetados pela infecção por leptospiras patogênicas. A cultura das células foi realizada no laboratório de Biologia Vascular (Instituto de Química - USP), sob supervisão do Dr. Ricardo Giordano, e as alíquotas de células LEC foram gentilmente cedidas pelo grupo.

As células LEC utilizadas foram cultivadas a 33°C, temperatura que mantém as características de linhagens primárias e altas taxas de crescimento durante sucessivas passagens, enquanto que, para a realização do *biopanning*, as células foram mantidas a 37°C por no mínimo 48h, permitindo assim sua diferenciação (LANGLEY *et al.*, 2003). As células Vero foram sempre cultivadas a 37°C.

Alíquotas das células congeladas em nitrogênio líquido foram mantidas em gelo seco até serem descongeladas diretamente em banho a 37°C. O conteúdo das alíquotas foi transferido para garrafas de cultura (25 ml) previamente preparadas com 7,5 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose with L-glutamine, Gibco®), acrescido de antibióticos (Penicilin/Streptomicin solution, Gibco®; 100 mg/1 L DMEM) e 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco®). As culturas eram então incubadas a 33°C (LEC) ou 37°C (Vero), com 5% CO_2.

As passagens das culturas foram realizadas a cada 1-3 dias, de acordo com a confluência das células. Para cada passagem, o meio foi aspirado para descarte e as células foram lavadas com 7,5-15 ml (garrafas de 25 ml ou 75 ml, respectivamente) de tampão PBS estéril. Após a lavagem, 0,5-1 ml de tripsina-EDTA (0.25% Trypsin-EDTA 1X, Gibco®) foram adicionados, seguido por incubação a 37°C por 2-5 min para o destacamento das células. As células foram então ressuspensas em novo meio DMEM 10% SFB e diluídas em mais meio, segundo a dinâmica de crescimento de cada linhagem. Finalmente, as novas culturas foram incubadas a 33°C ou 37°C, com 5% CO_2.

3.11. *Biopanning* e técnica BRASIL

Os *biopannings* das bibliotecas BBT1 e BBT2 foram realizados em células LEC e Vero, respectivamente, conforme descrito na literatura (BARBAS *et al.*, 2001) e pela técnica BRASIL (*Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands*) (GIORDANO *et al.*, 2001). O procedimento também foi realizado no laboratório de Biologia Vascular (Instituto de Química - USP) (Figura 11).

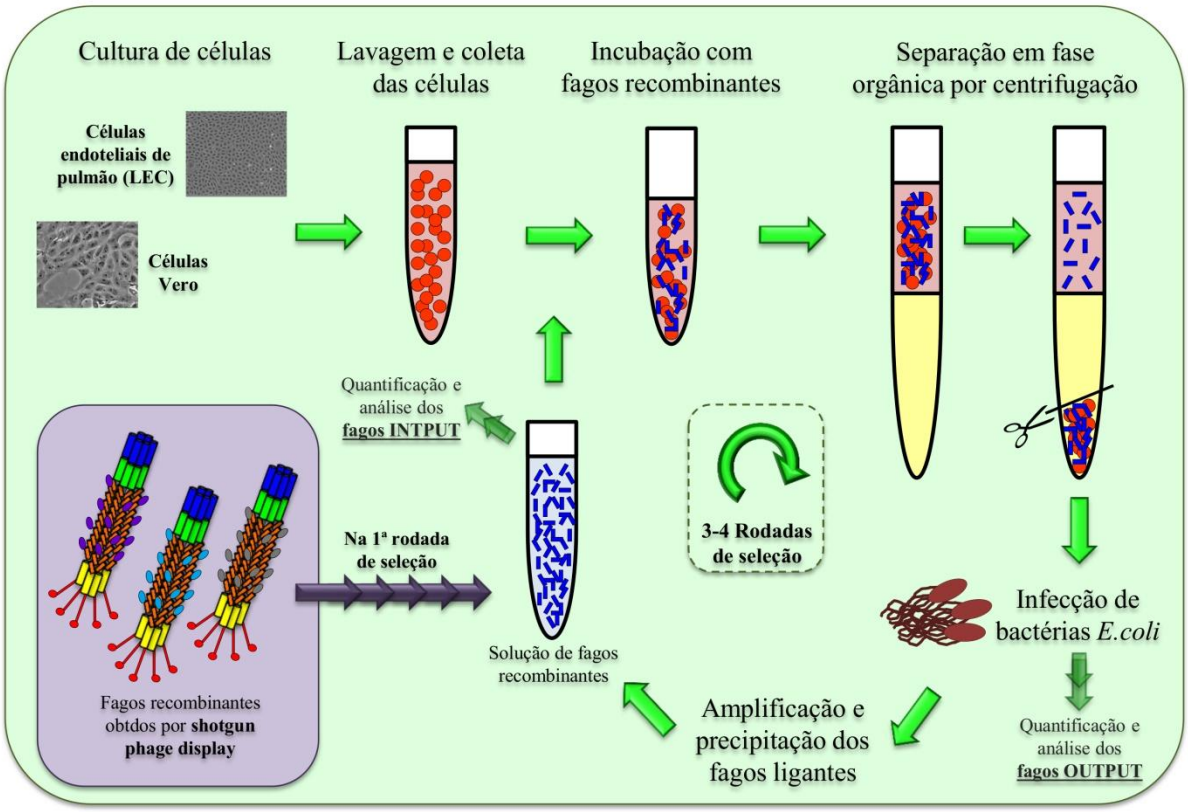


Figura 11. Esquema resumido da seleção de fagos recombinantes obtidos por *shotgun phage display* em células eucarióticas, através de *biopanning*-BRASIL. As células LEC ou Vero foram mantidas em cultura e posteriormente lavadas e coletadas para a incubação com fagos recombinantes. Na primeira rodada de seleção, os fagos recombinantes são originados da infecção de bactérias transformadas portando as bibliotecas com fagos auxiliares. Após incubação, os fagos livres e ligados às células são separados por centrifugação em fase orgânica (óleo BRASIL); o precipitado com as células e fagos ligantes é recuperado para infecção de novas bactérias, a fim de amplificar os fagos ligantes. Nas rodadas seguintes, os fagos recombinantes para incubação com novas culturas celulares são originados da amplificação e precipitação dos fagos ligantes da rodada anterior. Alíquotas de fagos adicionados às células (*fagos INPUT*) e dos fagos ligantes das células (*fagos OUTPUT*) foram coletadas em todas as rodadas para quantificação e análise. Figura adaptada de GIORDANO *et al.*, 2001.

3.11.1. *Biopanning*-BRASIL da biblioteca 1 (BBT1)

3.11.1.1. Amplificação dos fagos recombinantes apresentando a BBT1

O primeiro *biopanning* foi realizado com a BBT1, em células LEC. Inicialmente, 10 μg da BBT1 amplificada e purificada foram adicionados a 100 μl de bactérias *E. coli* TG1 eletrocompetentes para a transformação por eletroporação (2,5 kV, 200 Ω de resistência e 25 μF de capacitância; Bio-Rad® Gene Pulser II Electroporator). A cultura foi recuperada em 2 ml de meio SOC e incubada a 37°C sob agitação (250 rpm), por 40-60 min. Uma alíquota da cultura foi separada e diluída progressivamente a 10^{-8}-10^{-9} para determinação da eficiência de transformação. Posteriormente, foram adicionados 100 μl das últimas diluições em placas LB-ágar (meio acrescido de 100 μg/ml de ampicilina), as quais foram incubadas a 37°C, por ~16 h. O restante da cultura (~2 ml) foi adicionado a 13 ml de meio LB líquido estéril e pré-aquecido a 37°C e, após a adição de 3 μl de ampicilina (100 mg/ml) à cultura, esta foi incubada a 37°C sob agitação por 1 h. Em seguida, foram adicionados mais 4,5 μl de ampicilina à cultura, que foi novamente incubada a 37°C sob agitação por 1 h. Após a incubação, 100 μl do fago auxiliar M13KO7 ($1,4x10^{9}$ PFU/μl, ≈ 10^{11} fagos) foram adicionados à cultura, a qual foi transferida para 185 ml de meio LB líquido estéril e pré-aquecido a 37°C e, depois da adição de 92,5 μl de ampicilina (100 mg/ml), a cultura foi novamente incubada a 37°C sob agitação por 2 h. Após a incubação, foram adicionados 208 μl de canamicina (50 mg/ml) à cultura, a qual foi finalmente incubada a 37°C sob agitação, por ~16 h.

3.11.1.2. Descrição das rodadas de seleção em células LEC

A primeira rodada de seleção dos fagos foi iniciada com a precipitação dos fagos a partir da cultura de 200 ml, como descrito no item 3.9 desta seção, e o precipitado final com os fagos foi ressuspenso em 1 ml de meio DMEM (sem adição de antibióticos e SFB),

acrescido de 1% BSA e a solução foi centrifugada a 14000 rpm por 5 min a 4°C (Eppendorf® Centrifuge 5417 R, rotor FA-45-30-11), a fim de separar fragmentos bacterianos ainda presentes. O sobrenadante final foi transferido para um novo tubo e mantido em gelo. Posteriormente, uma cultura de bactérias *E. coli* TG1 foi preparada a partir da adição de 200 µl de cultura saturada, preparada no dia anterior, e posterior incubação a 37°C sob agitação até ser atingida uma DO_{600nm} de 1-1,2.

Como detalhado no item 3.10 desta seção, as células LEC utilizadas para o *biopanning* foram mantidas a 37°C por no mínimo 48h. A coleta das células foi realizada a partir da cultura de uma garrafa (75 ml) apresentando confluência de 80-100%, mantendo sempre as células em gelo. A cultura foi lavada 3 vezes com 10 ml de tampão PBS acrescido de 10 mM EDTA e a cultura foi incubada com 10 ml de PBS-EDTA adicionais por 10 min, antes do destacamento das células com a ajuda de um rodinho estéril. A solução com as células foi transferida para um tubo e submetida à centrifugação a 1000 rpm por 5 min a 4°C; o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µl de DMEM+1% BSA. Uma alíquota foi separada para a contagem das células em câmara de Neubauer, as quais totalizaram aproximadamente 10^6 células/100 µl. Foram separados 100 µl das células em um novo tubo onde foram adicionados 100 µl da solução de fagos precipitados anteriormente; a amostra foi misturada e incubada em gelo durante 3 h. Durante a incubação, foram adicionados 200 µl de óleo BRASIL (dibutilftalato:ciclohexano na proporção 9:1) a um tubo de 400 µl e, ao final da incubação, os 200 µl de células e fagos com a BBT1 foram cuidadosamente adicionados ao tubo com óleo BRASIL. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 10.000xg por 10 min a T.A. (Eppendorf® Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-11) para a separação das células com fagos ligantes dos fagos livres. A base do tubo contendo o precipitado celular embebido no óleo BRASIL foi cortada e transferida para um tubo, em que os fagos ligados às células foram ressuspensos com 500 µl da cultura previamente

preparada de TG1 (DO_{600nm} 1-1,2). A mistura foi então incubada por 30 min a T.A. para a infecção das bactérias.

Durante a incubação, foram preparadas diluições para a titulação dos fagos adicionados às células (fagos *Input*). A Figura 12 mostra o esquema das diluições em que 2 µl da solução de fagos precipitados foram diluídos. As últimas diluições foram adicionadas a 200 µl de bactérias TG1 (DO_{600nm} 1-1,2) cada e incubadas por 30 min a T.A.. Após a incubação, 50 µl de cada diluição foram espalhados em placas LB-ágar com ampicilina (100 µg/ml), as quais foram incubadas a 37°C, por ~16 h.

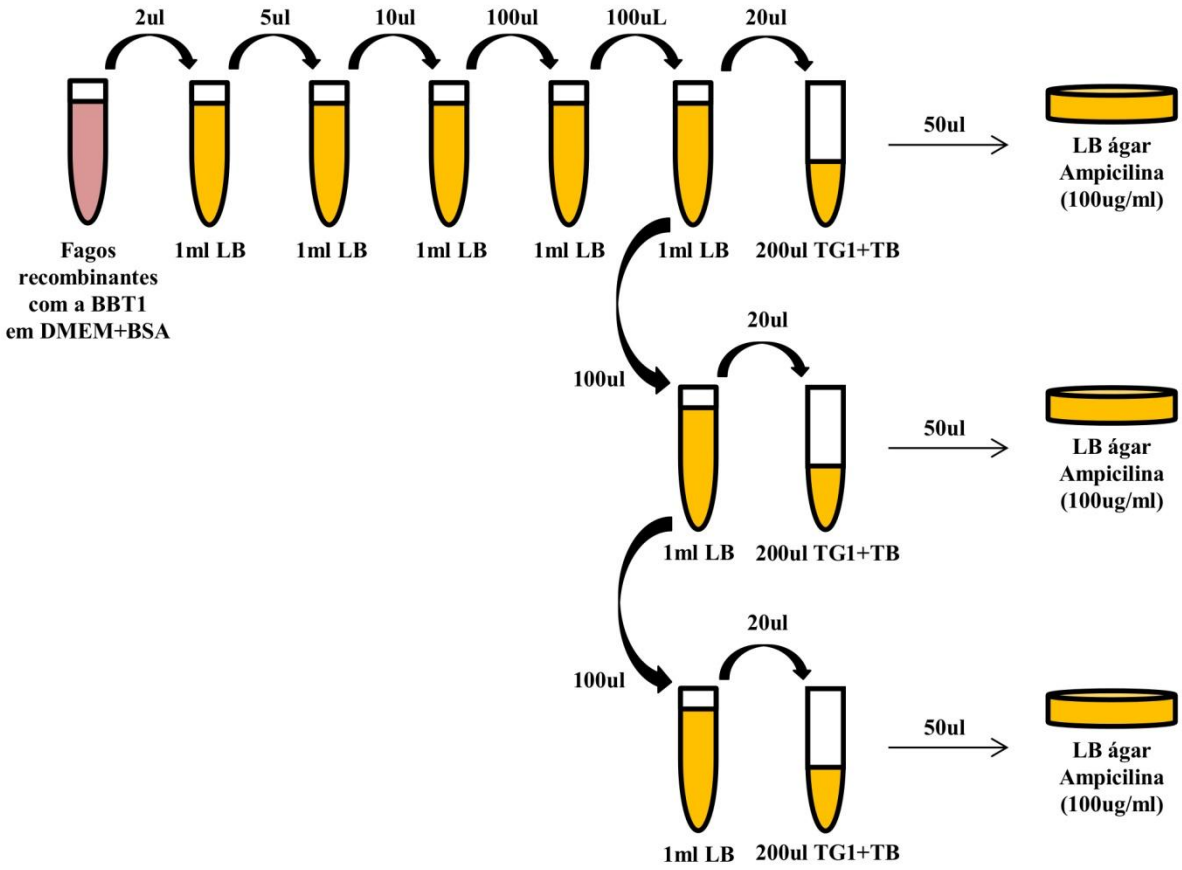


Figura 12. Esquema das diluições de amostras de fago adicionadas às células (fagos *Input*), realizadas durante o *biopanning*-BRASIL da BBT1. A diluição foi inicialmente feita em meio LB e posteriormente os fagos diluídos foram adicionados a culturas de bactérias TG1 para a infecção. Após incubação, alíquotas das infecções foram adicionadas a placas LB-ágar com ampicilina.

Ao final da incubação dos fagos aderidos às células LEC com bactérias TG1, uma alíquota de 2 µl foi separada e diluída para a titulação dos fagos ligantes (fagos *Output*). A amostra foi diluída a 10^{-6}-10^{-7} e 100 µl das últimas diluições foram adicionados a placas LB-ágar com ampicilina (100 µg/ml), as quais foram incubadas a 37°C, por ~16 h. O restante da infecção (~500 µl) foi adicionado a 7,5 ml de meio LB líquido estéril e pré-aquecido a 37°C e, após a adição de 1,6 µl de ampicilina (100 mg/ml) à cultura, esta foi incubada a 37°C sob agitação por 1 h. Em seguida, foram adicionados mais 2,4 µl de ampicilina à cultura, que foi novamente incubada a 37°C sob agitação por 1 h. Após a incubação, 100 µl do fago auxiliar M13KO7 ($1,4x10^{9}$ PFU/µl, ≈ 10^{11} fagos) foram adicionados à cultura, a qual foi transferida para 92 ml de meio LB líquido estéril e pré-aquecido a 37°C e, depois da adição de 46 µl de ampicilina, a cultura foi novamente incubada a 37°C sob agitação por 2 h. Após a incubação, foram adicionados 140 µl de canamicina (50 mg/ml) à cultura, a qual foi finalmente incubada a 37°C sob agitação, por ~16 h.

Além da primeira rodada de seleção dos fagos, o *biopanning* em células LEC da BBT1 incluiu mais 3 rodadas como a detalhada acima (total de 4 rodadas de seleção; Figura 11). A contagem de colônias foi realizada após cada rodada para a determinação da quantidade dos fagos *Input* e *Output*, definindo assim a progressão do número de fagos durante o *biopanning*.

3.11.2. *Biopanning*-BRASIL da biblioteca 2 (BBT2)

Por outro lado, o segundo *biopanning* foi realizado com a BBT2 e seguiu o mesmo protocolo, com algumas modificações. As alterações foram empregadas devido a aspectos indesejados resultantes do *biopanning* com a BBT1, como o excesso de fagos *Input* adicionados às células e o alto enriquecimento de fagos com o vetor pG8SAET vazio na última rodada de seleção. As modificações feitas estão listadas a seguir:

- O *biopanning* da BBT2 foi realizado com células Vero e em apenas 3 rodadas de seleção;

- As infecções com o fago auxiliar M13KO7 foram efetuadas com a adição de ~10^{10} fagos (contra ~10^{11} fagos para a BBT1);

- Antes de serem adicionados às células, os fagos recombinantes precipitados (fagos *Input*) foram diluídos em cada rodada (diluição 1:100 nas rodadas 1 e 2, e diluição 1:10 na rodada 3).

Da mesma forma que no *biopanning* da BBT1, a contagem de colônias foi realizada após cada rodada para a determinação da quantidade dos fagos *Input* e *Output*, definindo assim a progressão do número de fagos durante o *biopanning* da BBT2.

A partir das placas de LB-ágar para quantificação dos fagos *Input* e *Output*, colônias foram coletadas para análise por PCR e posterior validação por sequenciamento. Para o sequenciamento, as culturas das amostras consideradas positivas pela PCR de colônias foram amplificadas e seu DNA foi extraído e purificado, segundo o protocolo do kit illustra plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare Life Sciences®). Posteriormente a reação de amplificação foi preparada com 150 ng de DNA, 1,6 pmol do oligonucleotídeo específico para o vetor pG8SAET (*forward* ou *reverse*; Tabela 4) e com BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Life Technologies®). Após precipitação das amostras, as amplificações foram analisadas pelo sequenciador ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems®).

3.11.3. Análise dos clones obtidos a partir dos *biopannings*

As amostras sequenciadas dos *biopannings* da BBT1 e BBT2 foram posteriormente analisadas por alinhamento (Translated BLAST [BLASTx] ou Standard Protein BLAST [BLASTp]- http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para identificar a origem dos

fragmentos clonados e apresentados pelos fagos em *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Após a identificação das sequências, foi realizada sua tradução considerando as seis fases de leitura possíveis (três opções de iniciação na sequência senso e três opções de iniciação na sequência antisenso; EMBOSS Transeq - www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/), a fim de verificar se as sequências peptídicas de *L. interrogans* resultantes estariam em fase com a sequência sinal e a proteína VIII presentes no fagomídeo pG8SAET (Figura 6), garantindo sua apresentação na superfície do fago.

As proteínas de *L. interrogans* cujas sequências peptídicas se apresentaram em fase com o peptídeo sinal e/ou a proteína VIII foram analisadas através de programas de predição para o peso molecular e ponto isoelétrico aproximados (Compute pI/Mw - http://web.expasy.org/compute_pi/), a presença de regiões transmembrana (TMHMM Server v. 2.0 - www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/), de peptídeo sinal (Phobius - http://phobius.sbc.su.se/), para a possível localização subcelular (LocTree3 - https://rostlab.org/services/loctree2/; Gneg-mPLoc - www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Gneg-multi/; CELLO - http://cello.life.nctu.edu.tw/; PSORTb 3.0 - www.psort.org/psortb/) e possíveis domínios descritos (SSDB Motif Search - www.kegg.jp/). Proteínas de interesse são possíveis adesinas e, portanto, devem estar expostas na superfície da bactéria ou serem secretadas, apresentando região transmembrana e/ou peptídeo sinal em suas sequências peptídicas. Análises de hidropatia pelo método Kyte-Doolittle também foram realizadas (Kyte Doolittle Hydropathy Plot - http://gcat.davidson.edu/rakarnik/kyte-doolittle.htm).

3.12. Desenho de oligonucleotídeos para clonagem e expressão de proteínas recombinantes no vetor pAE

A fim de analisar as proteínas de interesse selecionadas a partir dos clones obtidos nos *biopannings*, foram desenhados oligonucleotídeos para sua clonagem e expressão. Para cada

proteína, foram clonadas três sequências: a sequência completa da proteína sem a região transmembrana/peptídeo sinal (*Full*), uma porção com a sequência apresentada pelo fago (*Phage*) e uma porção sem a sequência apresentada pelo fago para controle (*Non-Related*) (Figura 13A). O vetor de expressão escolhido foi o pAE, o qual possui um promotor derivado do fago T7 e produz um fenótipo de resistência a ampicilina em bactérias portadoras deste plasmídeo. O vetor também adiciona uma sequência de seis histidinas à porção amino-terminal da proteína recombinante, possibilitando a purificação das proteínas fusionadas por meio da cromatografia de afinidade a metais bivalentes, como afinidade a níquel, por exemplo (RAMOS *et al.*, 2004).

Os oligonucleotídeos desenhados para a amplificação senso (*forward*) possuem o sítio de restrição da enzima XhoI e, para a amplificação antisenso (*reverse*), os oligonucleotídeos foram desenhados com o sítio de restrição da enzima HindIII. O sítio das enzimas estão presentes no sítio de clonagem múltiplo do vetor pAE (Figura 13B). Os oligonucleotídeos utilizados foram sintetizados pela IDT® (*Integrated DNA Technologies*) e suas sequências estão listadas na Tabela 4.

3.13. Clonagem das sequências selecionadas a partir do *biopanning*

As sequências selecionadas de cada proteína foram amplificadas por PCR, utilizando um par de oligonucleotídeos específicos (Tabela 4) e seguindo o protocolo da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific®). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose e posteriormente extraídos do gel, segundo o protocolo do kit QIAquick Gel Extraction (Spin Protocol - QIAGEN®). O sistema do vetor pGEM®-T Easy Vector (Promega®) foi utilizado inicialmente para a clonagem. Como a amplificação com a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase resulta em fragmentos com extremidades cegas, os produtos amplificados e purificados foram previamente

submetidos à reação de adenilação com a enzima Taq DNA Polymerase (Sinapse Inc®) e 0,2 mM de dATP, a 72°C por 20 min.

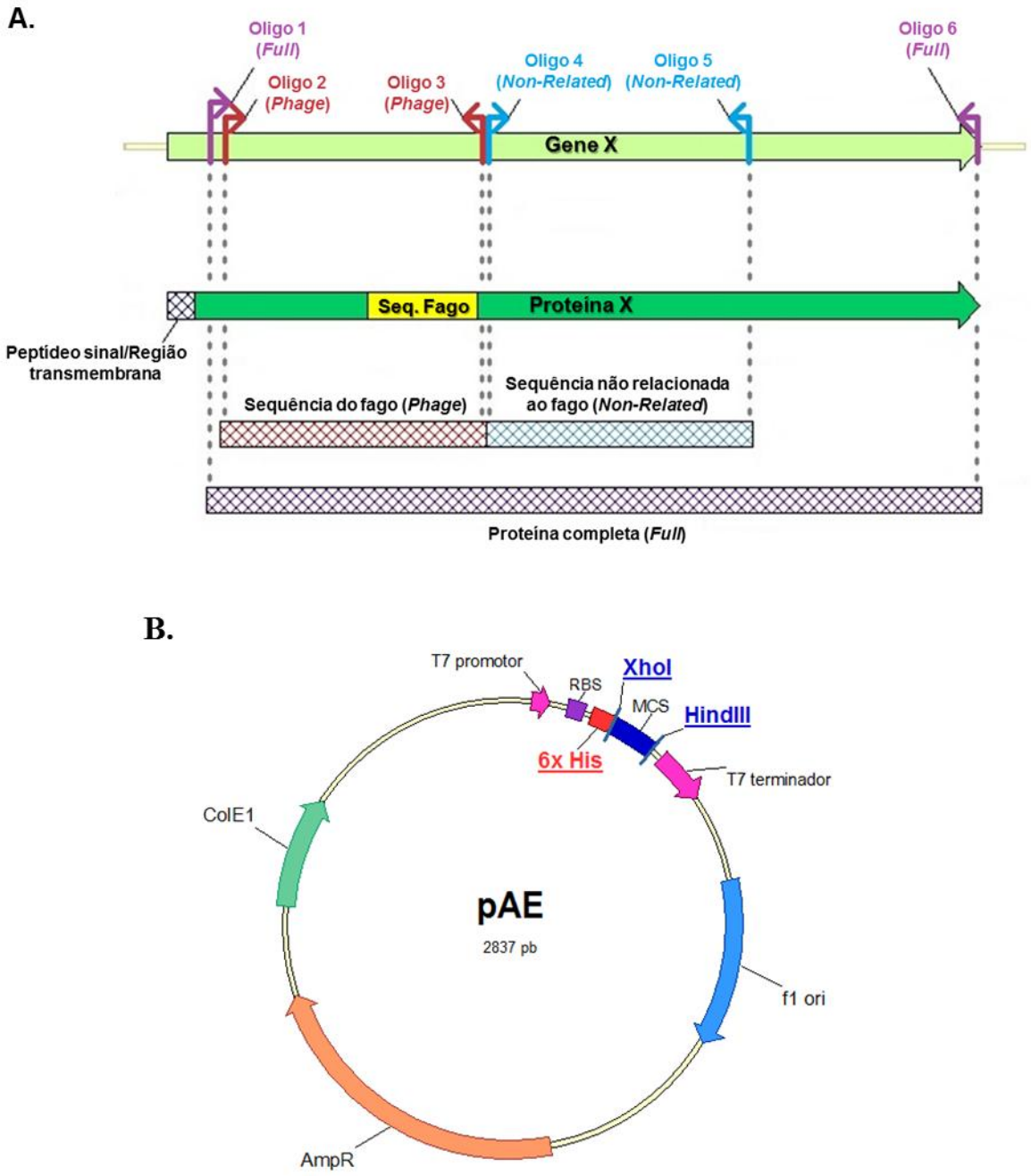


Figura 13. Clonagem das proteínas selecionadas através dos *biopannings* no vetor pAE. **A.** Esquema mostrando as três sequências para clonagem, determinadas para cada proteína: a sequência completa da proteína sem a região transmembrana/peptídeo sinal (*Full*), uma porção com a sequência apresentada pelo fago (*Phage*) e uma porção sem a sequência apresentada pelo fago para controle (*Non-Related*). Na figura estão representados exemplos das posições de oligonucleotídeos para a amplificação de cada sequência a partir do gene codificador da proteína apresentada. **B.** Representação do vetor pAE, escolhido para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes. O vetor possui um

promotor do tipo T7, seguido por uma sequência codificadora de 6 histidinas e pelo sítio de clonagem múltiplo (*MCS*), onde as sequências das proteínas recombinantes foram clonadas entre os sítios *XhoI* e *HindIII*. Dessa forma, a proteína recombinante resultante irá apresentar uma sequência de 6 histidinas na sua extremidade N-terminal, possibilitando sua purificação por cromatografia de afinidade. O vetor pAE também possui um gene de resistência ao antibiótico ampicilina (*AmpR*). Figura adaptada de RAMOS *et al*., 2004.

A ligação dos insertos adenilados ao vetor pGEM®-T foi realizada com relações vetor:inserto 1:1, 1:2, 1:3 ou 1:6, segundo o protocolo do kit, e as amostras ligadas foram adicionadas a alíquotas (50 µl) de bactérias *E. coli* DH10B eletrocompetentes para a transformação por eletroporação (2,5 kV, 200 Ω de resistência e 25 µF de capacitância; Bio-Rad® Gene Pulser II Electroporator). As bactérias transformadas foram adicionadas a placas LB-ágar contendo 100 µg/ml de ampicilina (resistência presente no vetor pGEM®-T), 40 µg/ml de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) e 0,1 mM de IPTG (Isopropil β-BD-1-tiogalactopiranosídeo), as quais foram incubadas a 37°C por ~16 h. Algumas das colônias brancas (positivas) foram avaliadas por PCR para a verificação da inserção dos fragmentos no vetor. As reações foram realizadas segundo o protocolo da enzima Taq DNA Polymerase (Sinapse Inc®), com a adição do par de oligonucleotídeos específico para cada sequência clonada (Tabela 4) e uma porção das colônias selecionadas separadamente. Em seguida, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose. As culturas das colônias consideradas positivas pela PCR foram amplificadas e seu DNA foi extraído e purificado, segundo o protocolo do kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN®). Posteriormente, os clones foram preparados para o sequenciamento com 150 ng de DNA, 1,6 pmol do oligonucleotídeo específico para cada sequência (*forward* ou *reverse*; Tabela 4) e com BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Life Technologies®). Após precipitação das amostras, as amplificações foram analisadas pelo sequenciador ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems®).

Tabela 4

Sequências dos oligonucleotídeos desenhados para análise de construções nos vetores pG8SAET e pG8NHP e para amplificação e clonagem no vetor pAE de sequências alvo das proteínas selecionadas nos *biopannings*.

Plasmídeos e Sequências alvo	Oligonucleotídeos
pG8SAET/pG8NHP	F†: 5′-ATCTGGTGGCGTAACACCTG-3′ R†: 5′-TATTCGGTCGCTGAGGCTTG-3′
LepA962	
LepA962F*	F: 5′-CCGCTCGAGAAATCTCAAAACAACCCTTTTTTC-3′ R: 5′-CCCAAGCTTTTATTGTTCCACACAAAGAATGC-3′
LepA962P*	F: 5′-CCGCTCGAGTCTATGATTCAACCGGATCTC-3′ R: 5′-CCCAAGCTTTTATACCCAGTCTATTTGTCCGTCTC-3′
LepA962NR*	F: 5′-CCGCTCGAGAAATCTCAAAACAACCCTTTTTTC-3′ R: 5′-CCCAAGCTTTTAAGTTTCGGCAGTATGAAGGTC-3′
LepA069	
LepA069F	F: 5′-CCGCTCGAGTCTATACGAGGCTCTGCTAACTTT-3′ R: 5′-CCCAAGCTTTCATCGATACGTATCCACTTCGG-3′
LepA069P	F: 5′-CCGCTCGAGGGAGATTTGATTCCTGACTTA-3′ R: 5′-CCCAAGCTTTCATCGATACGTATCCACTTCGG-3′
LepA069NR	F: 5′-CCGCTCGAGTCTATACGAGGCTCTGCTAACTTT-3′ R: 5′-CCCAAGCTTTCAAGCCAGACTCAATTCTCCGTC-3′
LepA388	
LepA388F	F: 5′-CCGCTCGAGTCATCGAATGATATTCCTAGT-3′ R: 5′-CCCAAGCTTTTACATCAATGTGCATCTACC-3′
LepA388P	F: 5′-CCGCTCGAGCAAAGACCTACTGATAAACCA-3′ R: 5′-CCCAAGCTTTTAACTACCTACCCGAGAATACAT-3′
LepA388NR	F: 5′-CCGCTCGAGTATAATTGGAATTGGGTGACG-3′ R: 5′-CCCAAGCTTTTAAGGTACATTTACTAACAACGC-3′
LepA271	
LepA271F	F: 5′-CCGCTCGAGGATGCTTCATCAAAAATTGAA-3′ R: 5′-CCCAAGCTTTTAAAATGGCAGAGCACACCT-3′
LepA402	
LepA402F	F: 5′-CCGCTCGAGTCTTCATCAAAAGCTAATTATTCG-3′ R: 5′-CCCAAGCTTTTACTGCAGAATACATCTACC-3′

*As denominações F, P e NR representam *Full*, *Phage* e *Non-Related*, respectivamente (ver explicação no texto).

†F: sequências de oligonucleotídeos senso (*forward*); R: sequências de oligonucleotídeos antisenso (*reverse*).

CTCGAG: sequência do sítio de restrição da enzima XhoI
AAGCTT: sequência do sítio de restrição da enzima HindIII

Os clones que possuíam as sequências corretas foram submetidos à digestão dupla com as enzimas de restrição XhoI e HindIII (0,7 FDU/µg de DNA; FastDigest, Thermo Scientific®). Após a digestão, os fragmentos resultantes foram analisados por eletroforese em gel de agarose e selecionados para a extração e purificação do gel, segundo o protocolo do kit QIAquick Gel Extraction (Spin Protocol - QIAGEN®). O vetor pAE também foi digerido com as mesmas enzimas de restrição (0,5 FDU/µg de DNA) e foi adicionalmente submetido a uma reação de defosforilação com fosfatase alcalina (0,8 U/µg de DNA; SAP, Fermentas®) antes de ser analisado e extraído do gel.

Para as reações de ligação, foram utilizadas as razões molares de 1:1, 1:2 ou 1:3 na relação vetor:inserto, a partir de 200 ng de vetor pAE. Além do vetor e fragmentos tratados, as reações de ligação continham 5 U (25 U/µg vetor) da enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific®) e seu tampão correspondente. As ligações foram feitas a 16°C por ~16 h, seguida por inativação da enzima a 65°C por 10 min. As amostras ligadas foram adicionadas a alíquotas (50 µl) de bactérias *E. coli* DH10B eletrocompetentes para a transformação por eletroporação, e as bactérias transformadas foram adicionadas a placas LB-ágar contendo 100 µg/ml de ampicilina. Algumas das colônias resultantes foram avaliadas por PCR para verificar a inserção dos fragmentos no vetor pAE e, em seguida, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose. As culturas das colônias consideradas positivas pela PCR foram amplificadas e seu DNA foi extraído e purificado, segundo o protocolo do kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN®). A integridade das amplificadas e purificadas foi avaliada através de reações de digestão com enzimas de restrição, e posterior análise das amostras digeridas por eletroforese em gel de agarose. As amostras de cada construção em pAE consideradas corretas foram selecionadas para a expressão das proteínas recombinantes em bactérias *E. coli*.

3.14. Teste da expressão das proteínas recombinantes em bactérias *E. coli*

Inicialmente, o teste da expressão das proteínas recombinantes foi realizado em duas cepas de bactérias *E. coli* BL21 quimiocompetentes: BL21 SI e BL21 (DE3)-Star pLysS. Aproximadamente 60 ng de cada construção em pAE foram adicionados a uma alíquota (50 µl) das duas cepas bacterianas e, em seguida, as amostras foram incubadas em gelo durante 30 min, passando por um choque térmico em banho a 42°C por 2 min e incubação em gelo novamente por mais 5 min. Para a recuperação das bactérias, foram adicionados 350 µl de meio LBON (BL21 SI) ou LB (BL21 (DE3)-Star pLysS) e as amostras foram incubadas a 30°C (BL21 SI) ou 37°C (BL21 (DE3)-Star pLysS), sob agitação (200 rpm) durante uma hora. Alíquotas de 20 µl e 200 µl de cada cultura resultante foram adicionadas a placas de cultura para análise: placas LBON-ágar com ampicilina (100 µg/ml) e posterior incubação a 30°C por ~16 h (BL21 SI), ou placas LB-ágar com cloranfenicol (30 µg/ml) e ampicilina, e posterior incubação a 37°C por ~16 h (BL21 (DE3)-Star pLysS).

Para cada construção em pAE, foram selecionadas três colônias de cada cepa bacteriana, as quais foram adicionadas a 5 ml de meio LBON Amp ou LB Clo Amp para incubação a 30°C ou 37°C, sob agitação por ~16 h. Uma amostra de cada pré-inóculo (500 µl) foi adicionada a 500 µl de glicerol 10%, a fim de armazenar alíquotas-estoque a -80°C para uso futuro. Para a indução da expressão das proteínas recombinantes, 500 µl de cada pré-inóculo foram inicialmente adicionados a 9,5 ml de meio LBON Amp ou LB Clo Amp e as culturas foram incubadas a 30°C ou 37°C sob agitação, até ser atingida uma DO_{600nm} de 0,6-0,8. Posteriormente, a indução de cada cultura foi realizada através da adição de 300 mM NaCl (BL21 SI) ou 1,2 mM IPTG (BL21 (DE3)-Star pLysS) e incubação a 30°C ou 37°C sob agitação, durante 3 horas. Uma alíquota de 1 ml de cada cultura foi coletada antes da indução (amostras não induzidas) e depois da indução (amostras induzidas), as quais foram centrifugadas (16100xg por 5 min a T.A.; Eppendorf® Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-11) e

os precipitados celulares resultantes foram armazenados a -20°C. Para a comparação das amostras não induzidas e induzidas em cada cepa bacteriana, os precipitados celulares foram preparados para análise através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

Um clone de cada construção em pAE apresentando melhor perfil de expressão foi escolhido para analisar a solubilidade das proteínas recombinantes expressas. Os clones foram novamente amplificados a partir do estoque em glicerol, em que alíquotas foram aplicadas a placas de LBON-ágar Amp ou LB-ágar Clo Amp e colônias selecionadas foram utilizadas para amplificação. As culturas resultantes foram induzidas como descrito acima. Os precipitados celulares resultantes foram ressuspensos em 100 µl do tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 6,8 ou 7,4, 50mM NaCl, 5 mM EDTA e 1 mg/ml de lisozima) e as células foram lisadas através de sonicação (30 seg com pulsos de 1,0 seg com intervalos de 1,0 seg e 20% de amplitude; Branson Digital Sonifier® 250). Após centrifugação das amostras lisadas (16100xg por 5 min a 4°C; Eppendorf® Centrifuge 5415 R, rotor F45-24-11), os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e os precipitados foram ressuspensos em 10 µl de tampão 8 M de ureia (50 mM Tris-HCl pH 6,8 ou 7,4, 500 mM NaCl, 5 mM de β-mercaptoetanol e 8 M de ureia). Os sobrenadantes foram precipitados com a adição de 1 ml de acetona em cada e, após centrifugação (16100xg por 10 min a 4°C), os sobrenadantes foram descartados e os precipitados resultantes foram ressuspensos em 10 µl de água Milli-Q. As alíquotas dos sobrenadantes tratados e dos precipitados celulares de cada amostra foram analisadas por SDS-PAGE.

Como as proteínas recombinantes analisadas eram expressas em corpúsculos de inclusão, um teste de expressão adicional foi realizado com a cepa *E. coli* Origami, na tentativa de aumentar a solubilidade das proteínas. A transformação de bactérias quimiocompetentes, a amplificação e indução das culturas foram realizadas como descrito acima, com algumas modificações: foram utilizadas placas LB-ágar com 12,5 µg/ml de

tetraciclina e 100 µg/ml de ampicilina para a seleção das bactérias transformadas, a amplificação das culturas foi testada com meio LB Amp com e sem 1% de glicose e a indução foi testada com diferentes concentrações do indutor IPTG (0,1 mM, 0,5 mM ou 1 mM) e com diferentes temperaturas (30°C ou 37°C). A análise da expressão, assim como da solubilidade das proteínas recombinantes expressas foi realizada como descrito acima.

3.15. Amplificação e expressão de proteínas recombinantes em média escala

Após a análise da expressão e da solubilidade das proteínas recombinantes, os clones selecionados das construções em pAE foram amplificados a partir do estoque em glicerol nas cepas BL21 SI ou BL21 (DE3)-Star pLysS. Uma alíquota de cada estoque foi aplicada em placas de LBON-ágar Amp ou LB-ágar Clo Amp e as colônias selecionadas foram adicionadas a 20-80 ml de meio LBON Amp ou LB Clo Amp para amplificação a 30°C ou 37°C sob agitação (200 rpm), por ~16 h. Os pré-inóculos resultantes foram adicionados a 0,5-2 L de meio correspondente e as culturas foram incubadas (30°C ou 37°C) sob agitação até ser atingida uma DO_{600nm} de 0,8-1. A indução de cada cultura foi realizada através da adição de 300 mM NaCl ou 1,2 mM IPTG e, posteriormente, as culturas foram novamente incubadas (30°C ou 37°C) sob agitação, durante 3-4 horas. Durante a amplificação e indução das culturas, uma alíquota de 1,5 ml de cada cultura foi coletada antes da indução (amostras não induzidas) e depois da indução (amostras induzidas), as quais foram centrifugadas (16100xg por 5 min a T.A.; Eppendorf® Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-11) e os precipitados celulares resultantes foram armazenados a -20°C para posterior análise. Após o período de incubação das culturas induzidas, todo o conteúdo foi centrifugado a 4000 rpm por 20 min a 4°C (Eppendorf® Centrifuge 5810 R, rotor A-4-62) e os precipitados celulares resultantes foram armazenados a -20°C.

Posteriormente, os precipitados celulares foram ressuspensos em 100 ml do tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 6,8 ou 7,4 e 500 mM NaCl) e as células foram submetidas à lise mecânica por 3-4 vezes, sob pressão de 1000-1300 bar (PandaPLUS 2000 Homogeneizer; GEA Niro Soavi®). Após a homogeneização das amostras, seu conteúdo foi centrifugado a 4000 rpm por 30 min a 4°C. Os sobrenadantes foram armazenados e os precipitados foram ressuspensos com 20 ml do tampão de solubilização (50 mM Tris-HCl pH 6,8 e 7,4, 500 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol e 2 M de ureia), e as amostras resultantes foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min a 4°C (Eppendorf® Centrifuge 5810 R, rotor F-34-6-38). Os precipitados foram lavados novamente com 20 ml do tampão de solubilização contendo 4 M de ureia e o precipitado final foi ressuspenso em 40 ml do tampão de solubilização contendo 8 M de ureia; os sobrenadantes resultantes de cada lavagem foram armazenados para posterior análise. Para garantir a máxima solubilização dos precipitados finais em 8 M de ureia, as amostras foram incubadas a T.A. sob leve rotação, por ~16 h.

Após o período de incubação para a solubilização das amostras, seu conteúdo foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e uma alíquota de 10 ml de cada amostra foi separada para testar a renaturação por diálise gradual (ver item 3.16.1 desta seção), enquanto que os precipitados foram novamente ressuspensos em 40 ml do tampão de solubilização com 8 M de ureia. Após uma segunda centrifugação, os precipitados resultantes foram ressuspensos em 10 ml do mesmo tampão e armazenados a 4°C, enquanto que os sobrenadantes de cada amostra foram reunidos aos sobrenadantes da centrifugação anterior, sendo também mantidos a 4°C.

3.16. Testes para a renaturação das proteínas recombinantes

A solubilização das proteínas recombinantes somente foi atingida em tampão contendo 8 M de ureia, condição que mantém as proteínas desnaturadas. Portanto, foram testadas duas

estratégias para a renaturação das proteínas recombinantes: diálise gradual e altas pressões hidrostáticas.

3.16.1. Diálise gradual

A diálise gradual foi realizada para testar a renaturação das proteínas recombinantes em solução com 8 M de ureia, através da diminuição gradual da concentração de ureia na solução.

Como mencionado no item 3.15 desta seção, 10 ml foram separados do sobrenadante das amostras em 8 M de ureia, os quais foram diluídos para um total de 50 ml. Para a diálise, cada amostra foi dividida em dois sacos de diálise (SnakeSkin Dialysis Tubing, 7000 MWCO; Life Technologies®), os quais foram inicialmente submersos em 1 L de tampão para diálise contendo 6 M de ureia (50 mM Tris-HCl pH 6,8 ou 7,4, 500 mM NaCl, 1% Glicina e 6 M de ureia). As diálises foram incubadas a 4°C e as soluções eram continuamente homogeneizadas com o uso de agitadores magnéticos. Após a incubação de aproximadamente 5 horas, os tampões resultantes foram substituídos por tampão contendo 4 M de ureia e as diálises foram incubadas sob as mesmas condições, por ~16 h. Os tampões das diálises foram substituídos por mais duas vezes: primeiramente pelo tampão contendo 2 M de ureia durante aproximadamente 5 horas e, em seguida, as amostras foram incubadas com tampão sem ureia e 0,1% de Glicina, por ~16 h.

Após a diálise, o conteúdo de cada amostra foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min a 4°C (Eppendorf® Centrifuge 5810 R, rotor F-34-6-38). Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e os precipitados foram ressuspensos em 20 ml de tampão com 8 M de ureia (50 mM Tris-HCl pH 6,8 ou 7,4, 500 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol e 8 M de ureia). Alíquotas de cada amostra foram preparadas para análise por SDS-PAGE.

3.16.2. Renaturação por altas pressões hidrostáticas

Outra estratégia para a renaturação das proteínas foi a utilização de altas pressões hidrostáticas, a qual foi realizada no Centro de Biotecnologia do IPEN (Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares), com o auxílio da Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias e de sua equipe. A técnica consiste na dissociação e renaturação de proteínas em agregados através da alta pressão aplicada nas amostras que promove a hidratação de resíduos hidrofóbicos e carregados presentes nas proteínas, diminuindo o volume do sistema e desfavorecendo as interações hidrofóbicas e eletrostáticas intermoleculares (LEE *et al.*, 2006). Agentes caotrópicos como hidrocloreto de guanidina, e sistemas redox como o da glutationa reduzida e oxidada (GSH/GSSG), podem ser acrescentados às amostras para romper as pontes de hidrogênio e rearranjar pontes dissulfeto não nativas em nativas, respectivamente.

As amostras utilizadas para a renaturação por altas pressões hidrostáticas consistiam em corpúsculos de inclusão contendo as proteínas recombinantes de interesse. Para a preparação dos corpúsculos de inclusão, os clones selecionados das construções em pAE foram amplificados a partir do estoque em glicerol nas cepas BL21 SI ou BL21 (DE3)-Star pLysS. Culturas de 0,5-2 L foram preparadas e induzidas como descrito no item 3.15 desta seção. Os precipitados celulares de cada cultura foram ressuspensos em 50-100 ml de tampão A1 (100 mM Tris-HCl pH 7,4 e 5 mM EDTA) e, em seguida, foram incubados com 50 µg/ml de lisozima durante 15 min a T.A.. Após a adição de 0,1% de deoxicolato de sódio, as amostras foram submetidas à lise mecânica por 3-4 vezes, sob pressão de 1000-1300 bar (PandaPLUS 2000 Homogeneizer; GEA Niro Soavi®). As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 8.500 rpm por 10 min a 4°C (Eppendorf® Centrifuge 5810 R, rotor F-34-6-38); os sobrenadantes foram armazenados e os precipitados foram ressuspensos em 50 ml do tampão A2 (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM EDTA e 0,1% deoxicolato de sódio). Após uma rápida sonicação para desfazer os grumos, as amostras foram centrifugadas a 8.500 rpm por

10 min a 4°C; os sobrenadantes foram armazenados e os precipitados foram lavados mais uma vez com o tampão A2. Os precipitados resultantes foram lavados com 50 ml do tampão A3 (100 mM Tris-HCl pH 7,4 e 1 mM EDTA) e os precipitados finais contendo os corpúsculos de inclusão foram ressuspensos em 10 ml de tampão A3, sendo posteriormente distribuídos em alíquotas de 1 ml, submetidos à medição da DO_{350nm} e armazenados a -20°C.

Um teste foi realizado para comparar a renaturação das proteínas em seis condições distintas. As suspensões com os corpúsculos de inclusão foram diluídas em tampão Tris-EDTA (50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA) para uma DO_{350nm} igual a 1 e a presença ou ausência de 5 mM GSH/GSSG (1:1), 500 mM L-arginina pH 11,0 e/ou 1 M hidrocloreto de guanidina (Gdn-HCl) foram testadas, segundo a Tabela 5. As amostras em cada condição foram aplicadas separadamente em pequenas bolsas plásticas seladas por calor, as quais foram colocadas em uma bolsa plástica maior selada a vácuo. Posteriormente, as bolsas foram imersas em óleo, usado como um fluido transmissor de pressão, no recipiente do equipamento de alta pressão (R4-6-40, High-Pressure Equipment Company®) (RODRIGUES *et al.*, 2014); as amostras foram submetidas a uma pressão de 2,5 kbar, por ~16 h. Após a incubação sob pressão, o conteúdo de cada bolsa plástica foi centrifugado a 12000 rpm por 15 min a 4°C (Eppendorf® Centrifuge 5415 R, rotor F45-24-11). Os precipitados resultantes foram ressuspensos no mesmo volume de tampão 8 M de ureia (50 mM Tris-HCl pH 6,8 ou 7,4, 500 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol e 8 M de ureia) e os sobrenadantes foram preparados para diálise em tubos de mini diálise (Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Device, 10K MWCO, 2 ml; Life Technologies®) ou em sacos de diálise (SnakeSkin Dialysis Tubing, 10K MWCO; Life Technologies®). Para as diálises, foi utilizado o tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,8 e as amostras foram mantidas em homogeneização constante a 4°C. Primeiramente as amostras foram incubadas por ~16 h e, em seguida, os tampões foram trocados antes de uma segunda incubação por 3-4 horas. Após as diálises, as amostras foram centrifugadas novamente e, em

seguida, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e os precipitados resultantes foram ressuspensos em 100 µl de tampão 8 M de ureia. Finalmente, alíquotas de cada amostra foram analisadas por SDS-PAGE.

Tabela 5

Comparação da composição das seis condições testadas para testar a renaturação de proteínas recombinantes por altas pressões hidrostáticas.

Reagentes utilizados	**Condições testadas**					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Amostra	= DO_{350nm} 1	= DO_{350nm} 1	= DO_{350nm} 1	= DO_{350nm} 1	= DO_{350nm} 1	= DO_{350nm} 1
Tris-EDTA pH 8,0	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
L-arginina pH 11,0	---	---	500 mM	500 mM	---	---
Gdn-HCl	---	---	---	---	1 M	1 M
GSH/GSSG	---	5 mM (1:1)	---	5 mM (1:1)	---	5 mM (1:1)

3.17. Purificação das proteínas recombinantes em 8 M de ureia

Como as tentativas de renaturação não foram bem sucedidas, além do rendimento insuficiente da expressão de algumas das proteínas recombinantes, apenas uma das proteínas (LepA388P) foi priorizada para a obtenção de anticorpos em camundongos. Antes das imunizações, a amostra utilizada para purificação continha a proteína solúvel em 8 M de ureia (ver item 3.15 desta seção), os quais foram submetidos à filtração (filtros de 0,45 µM) para retirar possíveis precipitados remanescentes.

A amostra filtrada foi então submetida à purificação através do ÄKTAprime plus (GE Healthcare Life Sciences®). Para a purificação, foi utilizada a coluna HisTrap HP de 1 ml (GE Healthcare Life Sciences®) e os tampões utilizados para lavagem e eluição possuíam a mesma composição das amostras aplicadas, com a adição de 20 mM e 500 mM de imidazol, respectivamente. O protocolo para eluição da proteína recombinante foi baseado no modelo

de “His Tag Purification HisTrap” do ÄKTA, em que a purificação de proteínas é feita por eluição em gradiente. Alíquotas de amostras retiradas durante o processo de purificação foram preparadas para análise por SDS-PAGE. As amostras de eluição que apresentaram a proteína recombinante purificada foram reunidas e novamente analisadas em SDS-PAGE, onde também foi aplicada uma curva de BSA com concentrações conhecidas (1 µg/µl, 0,5 µg/µl, 0,25 µg/µl, 0,125 µg/µl e 0,0625 µg/µl). A concentração da proteína recombinante foi estimada pela comparação das bandas resultantes através da ferramenta ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*, NIH).

3.18. Imunização de camundongos com a proteína LepA388P para obtenção de antissoro

Os camundongos BALB/c utilizados para a obtenção de antissoro pertenciam ao sexo feminino, com 35 dias de idade e com peso de 18-22 g. O grau de invasividade segundo definições do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) foi classificado como GI1, em que os experimentos causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse nos animais.

Foram administradas quatro doses por via intraperitoneal, em intervalos de 6-8 dias. Em cada dose, os camundongos foram imunizados com 10 µg de LepA388P e 100 µg de hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$) diluídos em 500 µl de solução salina estéril (0,9% de NaCl). Para a coleta de sangue, os camundongos foram previamente anestesiados com um colírio de cloridrato de proximetacaína (1 gota/olho) e as coletas foram realizadas via retro-orbital antes da primeira dose (soro pré-imune) e após a terceira e quarta doses (soros imunes), onde foram coletadas amostras de aproximadamente 200 µl/animal. Após a comprovação da indução de anticorpos específicos nos antissoros, os camundongos foram sacrificados através da administração de uma dose letal de anestésico por via intraperitoneal (solução de cloridrato de xilazina [60 mg/kg] e cloridrato de cetamina [300 mg/kg]). O esquema das imunizações e

coletas de sangue está detalhado na Figura 14. Uma cópia do certificado concedido pela CEUAIB (Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan) para a utilização de animais neste projeto se encontra na seção ANEXOS (A).

Após cada coleta de sangue, as amostras foram incubadas primeiramente em uma estufa a 37°C por ~20 min e, em seguida, a 4°C por ~15 min, a fim de permitir a formação e a concentração de coágulo em cada amostra, respectivamente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm a 4°C por 10 min, e o sobrenadante com o soro foi transferido para novos tubos. Se preciso, as amostras eram centrifugadas novamente para garantir a remoção de possíveis células vermelhas remanescentes. As amostras resultantes de cada coleta foram reunidas em um único tubo (“pool” dos soros individuais) e armazenadas a -20°C para posterior análise.

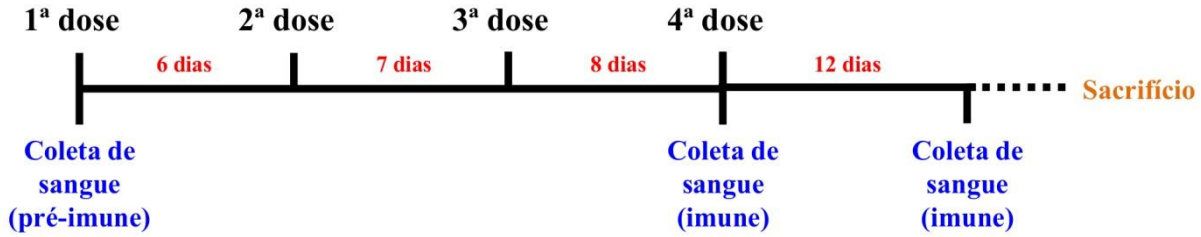


Figura 14. Esquema da obtenção de antissoros da proteína LepA388P. Foram administradas quatro doses da proteína purificada em intervalos de 6 a 8 dias. As coletas de sangue para a obtenção dos antissoros pré-imune e imune foram realizadas antes da 1ª dose e na 4ª dose, respectivamente. Uma coleta de sangue adicional foi feita 12 dias após a última dose da proteína, antes do sacrifício dos camundongos.

3.19. Análise do antissoro da proteína LepA388P

3.19.1. Titulação por ELISA

O ensaio de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) foi utilizado para verificar o nível total de anticorpos nos antissoros de LepA388P obtidos. Foram utilizadas placas de poliestireno com 96 cavidades (Nunc MaxiSorp flat-bottom 96 well plates, Thermo

Scientific®), as quais foram sensibilizadas com 1 µg/ml (100 µl/cavidade) da proteína LepA388P purificada, diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9,6) e incubadas a 4°C por ~16 h. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão PBS-T (PBS 1X com 0,1% de Tween 20) e foram adicionados 100 µL/cavidade da solução de bloqueio (PBS-T com 10% de leite desnatado), seguido por incubação a 37°C durante 1 h. As placas foram lavadas novamente com PBS-T e os antissoros imunes e pré-imune da proteína LepA388P foram diluídos seriadamente em PBS-T com 1% de BSA, a partir de 1:20 até 1:20.480 ou 1:1.000 até 1:1.024.000 (100 µL/cavidade); em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 1 h e 30 min. Após as lavagens das placas, foi adicionado o anticorpo anti-IgG de camundongos conjugado com peroxidase, diluído 1:10.000 em PBS-T com 1% de BSA (100 µL/cavidade); em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por mais 1 h. Finalmente, as placas foram lavadas e reveladas com 100 µL/cavidade da solução de revelação (100 mM de citrato de sódio, 300 mM de fosfato de sódio monobásico [NaH_2PO_4], 10 mg de OPD [dicloridrato de o-fenilenodiamina] e 10 µl de H_2O_2, para cada 20 ml de solução). Após incubação a T.A. durante 5-10 min, a reação foi interrompida através da adição de 50 µL/cavidade de H_2SO_4 8 M e, finalmente, o título dos antissoros foi determinado a partir da absorbância de cada cavidade medida a 492 nm pelo fotômetro Multiskan EX Microplate (Thermo Scientific®). O título do anticorpo foi definido pela diluição que apresentou uma absorbância a 492 nm de aproximadamente 0,1, após subtração da absorbância obtida pelo controle negativo (sem adição de antissoros).

3.19.2. *Western blotting* com proteínas recombinantes de *Leptospira*

O antissoro da proteína LepA388P foi testado quanto à especificidade pela proteína recombinante LepA388P em relação a outras proteínas recombinantes de *Leptospira*, previamente preparadas em nosso laboratório. Para a análise da especificidade do antissoro

obtido, foram preparadas amostras com 130 ng das proteínas recombinantes LepA388P, LipL32, LIC10009 e HlyX, as quais foram submetidas à SDS-PAGE. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond ECL, GE Healthcare Life Sciences®) a 10 V durante 1 h, através de sistema semi-seco (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad®). Posteriormente, as membranas foram lavadas rapidamente com PBS-T e incubadas com o corante Ponceau, a fim de verificar a transferência das proteínas para as membranas. Após lavagem com água destilada e PBS-T, as membranas foram incubadas com a solução de bloqueio (PBS-T com 10% de leite desnatado), a T.A. por 3-4 horas ou a 4°C por ~16 h. O bloqueio foi descartado e as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T, antes da incubação com o antissoro da proteína LepA388P (1:10.000 em PBS-T com 2% de leite desnatado) por 1 h e 30 min. Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas por 1 h com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:10.000 em PBS-T com 2% de leite desnatado). As membranas foram lavadas novamente e, em seguida, cada membrana foi tratada com 1,0 ml da solução A e 1,0 ml da solução B do kit de detecção (Amersham® ECL Prime WB Detection Reagent; GE Healthcare Life Sciences®), com posterior incubação por ~5 min. Em seguida, a luminescência resultante nas membranas foi detectada e documentada através do transiluminador Kodak Gel Logic 2200 (Carestream®).

3.19.3. Preparação de extratos de *Leptospira* e *Western blotting* com painel de sorovares

O antissoro da proteína LepA388P foi também testado quanto ao reconhecimento de proteínas nativas em diferentes sorovares de *Leptospira*. Inicialmente, extratos de diferentes sorovares de *Leptospira* foram preparados a partir de culturas de 10 ml. Os sorovares utilizados incluem: *L. interrogans* pertencentes aos sorovares Copenhageni (cepa Fiocruz L1-

130), Pomona (cepa Kennewicki), Batavie (cepa Van Tienen), Icterohaemorrhagiae (cepa RGA); *L. borgpetersenii* sorovar Castellonis (cepa Castellon 3); *L. kirschneri* sorovar Grippotyphosa (cepa Moska V); *L. noguchii* sorovar Panama (cepa CZ 214 K); *L. biflexa* sorovar Patoc (cepa Patoc I 'Paris'). Após centrifugação das culturas (6.000 rpm a 4°C por 20 min; Eppendorf® Centrifuge 5810 R, rotor F-34-6-38), os precipitados celulares resultantes foram ressuspensos em 500 µl de PBS 1X estéril com 1 µl de inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich®) e as células foram lisadas mecanicamente pela adição de beads (~0,1 mm), seguida por agitações vigorosas (Mini-Beadbeater-1, Biospec Products®). As amostras resultantes foram transferidas para novos tubos e a concentração de proteínas em cada foi determinada com o kit Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad®), a partir da absorbância a 595 nm.

A fim de detectar proteínas nativas nos distintos sorovares, foram preparadas amostras com 300 µg de cada extrato de *Leptospira* e 10 ng da proteína recombinante LepA388P, as quais foram submetidas à SDS-PAGE. Em seguida, foi realizada a transferência semi-seca das proteínas para membranas de nitrocelulose e *Western blotting*, segundo os mesmos procedimentos descritos acima (ver item 3.19.2 desta seção).

Após a revelação, a mesma membrana foi submetida à retirada dos anticorpos primários e secundários ("*stripping*") pela incubação com uma solução composta por 100 mM de β-mercaptoetanol, 2% de SDS e 62,5 mM de Tris-HCl pH 6,7. Depois de 30 min de incubação, a membrana foi lavada com água destilada e PBS-T e, em seguida, foi novamente incubada com a solução de bloqueio. Finalmente, a membrana foi sensibilizada com o antissoro da proteína LipL32 (diluído 1:10.000 em PBS-T), seguindo o mesmo protocolo de *Western blotting* ("*reprobing*").

3.20. Culturas de *L. interrogans* em diferentes temperaturas e osmolaridade

A detecção da expressão de proteínas nativas também foi avaliada em bactérias *L. interrogans*, cultivadas em diferentes temperaturas e níveis de osmolaridade, resultando em quatro grupos experimentais (Tabela 6): um grupo controle em condições normais de cultivo *in vitro* (30°C e sem adição de NaCl no meio EMJH), e outros três grupos testes em condições que mimetizam componentes do ambiente fisiológico do hospedeiro (37°C e/ou adição de 120 mM de NaCl no meio EMJH). Este experimento foi baseado no protocolo de Matsunaga e colaboradores (MATSUNAGA *et al.*, 2005).

Tabela 6

Relação das diferentes condições testadas para o cultivo de bactérias *L. interrogans* sorovar Copenhageni (cepa Fiocruz L1-130), em que foram testadas diferentes temperaturas (30°C ou 37°C) e níveis de osmolaridade (meio EMJH ou meio EMJH suplementado com 120 mM NaCl). As condições sublinhadas destacam as mudanças realizadas, em comparação à condição de cultivo normal *in vitro* (Grupo 1 controle). Cada cultura foi mantida por 24 horas antes da análise das amostras.

Grupos experimentais	**Condições testadas**	
	Meio de cultura	**Temperatura**
1 (controle)	EMJH	30°C
2 (teste)	EMJH	37°C
3 (teste)	EMJH + 120 mM NaCl	30°C
4 (teste)	EMJH + 120 mM NaCl	37°C

Bactérias *L. interrogans* sorovar Copenhageni (cepa Fiocruz L1-130) cultivadas em meio EMJH a 30°C durante cinco dias após repique foram divididas em quatro tubos com 30 ml de cultura cada e coletadas por centrifugação (6.000 rpm por 15min a T.A; Eppendorf® Centrifuge 5810 R, rotor F-34-6-38). Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 30 ml de meio EMJH ou meio EMJH suplementado com 120 mM de NaCl e, em seguida, cada amostra foi dividida em dois tubos de cultura (15 ml/tubo), a fim de realizar uma duplicata para cada condição estabelecida. As culturas foram incubadas a 30°C ou 37°C durante 24

horas e, após a incubação, as amostras foram centrifugadas separadamente (6.000 rpm por 15min a 4°C), para a coleta dos sobrenadantes e precipitados celulares resultantes.

3.20.1. Preparação de extratos de *L. interrogans* e imunoprecipitação dos sobrenadantes das culturas

Os precipitados celulares foram utilizados para a preparação de extratos, seguindo o mesmo protocolo feito com os diferentes sorovares de *Leptospira* (ver item 3.19.3 desta seção), com a exceção de que estes precipitados celulares foram ressuspensos em 200 µl totais de PBS 1X filtrado contendo 1 µl de inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich®). Em seguida, os extratos foram quantificados com o kit Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad®), a partir da absorbância a 595 nm, e preparados para análise por SDS-PAGE.

Por outro lado, alíquotas de 995 µl dos sobrenadantes foram submetidas à imunoprecipitação com o antissoro da proteína LepA388P, o qual foi adicionado às alíquotas dos sobrenadantes na proporção 1:200 (5 µl em cada), seguido por incubação a 4°C sob leve rotação, por ~16 h. Posteriormente, foram adicionados 25 µl de resina conjugada à proteína A (Protein A Sepharose CL-4B, Pharmacia®) em cada imunoprecipitação, e as amostras resultantes foram incubadas a 4°C sob leve rotação, por 4 h. Após a incubação, as amostras foram lavadas com 1 ml de PBS 1X filtrado e centrifugadas a 2.000 rpm por 1 min a T.A. (Eppendorf® Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-11). Os sobrenadantes resultantes foram descartados e a lavagem foi repetida por mais duas vezes. Finalmente, os precipitados resultantes foram ressuspensos em 100 µl totais de tampão SDS 1X (ver item 3.21.2 desta seção) e preparados para análise por SDS-PAGE.

3.20.2. *Western blotting* com os extratos e sobrenadantes imunoprecipitados das culturas de *L. interrogans* em diferentes condições de cultivo

Para a detecção de proteínas nativas em bactérias L. interrogans cultivadas em diferentes condições de temperatura e osmolaridade, foram preparadas amostras com ~200 µg de cada extrato preparado, as quais foram submetidas à SDS-PAGE juntamente com 35 µl de cada sobrenadante imunoprecipitado. Em seguida, foi realizada a transferência semi-seca das proteínas para membranas de nitrocelulose e *Western blotting*, segundo os mesmos procedimentos descritos acima (ver item 3.19.2 desta seção).

Como controle, a mesma membrana sensibilizada com o soro anti-LepA388P foi submetida aos mesmos procedimentos de "*stripping and reprobing*" detalhados acima (ver item 3.19.3 desta seção). Primeiramente, a membrana foi novamente incubada com a solução de bloqueio e, em seguida, foi sensibilizada com o antissoro da porção amino-terminal da proteína LigB (diluído 1:10.000 em PBS-T) para posterior revelação, seguindo o mesmo protocolo de *Western blotting*. Um controle adicional foi realizado através da repetição de um segundo procedimento de "*stripping and reprobing*", a partir da sensibilização da mesma membrana com o antissoro da proteína LipL32 (também diluído 1:10.000 em PBS-T).

3.21. Migrações eletroforéticas

3.21.1. Eletroforese em gel de agarose

Após tratamentos como fragmentação, digestão e amplificação por PCR, amostras de DNA em geral foram analisadas e/ou extraídas de géis de agarose. As amostras foram diluídas em tampão para aplicação em gel (0,02% Azul de bromofenol, 0,042% Xileno cianol e 5% Glicerol) e adicionadas a géis com 1% de agarose em tampão TAE (40 mM Tris Base, 1 mM EDTA e 20 mM Ácido acético glacial). Brometo de etídio (agente intercalante de DNA) foi acrescentado durante a preparação dos géis. Geralmente, as migrações eletroforéticas foram

realizadas sob 80-100 Volts e, posteriormente, as bandas de DNA resultantes da migração foram visualizadas através de transiluminação com luz ultravioleta, devido à emissão de luz a partir do brometo de etídio quando exposto à luz UV.

O marcador utilizado para as análises foi o 1kb plus DNA Ladder (Life Technologies®).

3.21.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

Amostras contendo proteínas foram analisadas através da eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, ou SDS-PAGE. A maioria dos géis foi preparada com 12% de acrilamida e as amostras foram diluídas em tampão SDS 1X (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% Dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,1% azul de bromofenol, 10% Glicerol e 200 mM β-mercaptoetanol) e incubadas a 95°C por 10 min antes da aplicação nos géis. As migrações eletroforéticas foram realizadas sob 80-140 Volts em tampão Tris-glicina (25 mM Tris base, 192 mM Glicina e 5% SDS) e, em seguida, os géis foram incubados com o corante azul de Coomassie (3 mM Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% Ácido acético glacial e 45% Etanol absoluto). Para análise das bandas resultantes das migrações, os géis foram posteriormente incubados em descorante (30% Etanol absoluto e 10% Ácido acético glacial).

O marcador utilizado para as análises foi o Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare Life Sciences®), diluído em tampão SDS 1X.

Para a análise das culturas de *L. interrogans* em diferentes temperaturas e osmolaridade (ver item 3.20 desta seção), foi utilizado um gel preparado com 8% de acrilamida e o marcador utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare Life Sciences®), diluído em tampão SDS 1X.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização da construção de bibliotecas através de ligação *blunt-end*

Como a estratégia de ligação *blunt-end* para a construção de bibliotecas apresentou diversas limitações em trabalhos realizados anteriormente no nosso laboratório, optou-se por testar algumas variáveis durante o processo de clonagem a fim de melhorar a qualidade das bibliotecas. Nas padronizações realizadas, os parâmetros testados incluíram a digestão e defosforilação do fagomídeo pG8SAET, a razão molar da relação vetor:inserto, a quantidade de T4 DNA ligase e a presença ou ausência de PEG (Tabela 3 da seção Material e Métodos). Os resultados das principais padronizações estão apresentados a seguir.

Em um dos testes, o tratamento do vetor pG8SAET consistiu em uma reação de digestão com SnaBI e duas reações de defosforilação antes das reações de ligação, as quais foram realizadas com as razões molares de 1:1, 1:3 e 1:6 na relação vetor:inserto e com 3.200 U da enzima T4 DNA ligase/μg de vetor, para cada reação. O resultado da eficiência de transformação com cada ligação foi obtido a partir dos números totais de colônias resultantes, os quais estão representados na Figura 15. É possível observar que a razão molar de 1:6 (amostra VDL 1:6) resultou em maior eficiência, apesar do valor apresentado por esta amostra ser de apenas 2,2 e 13 vezes maior que o valor apresentado pela amostra VDL 1:3 e pela amostra controle VD (Vetor Digerido sem ligase e sem insertos), respectivamente.

A análise de algumas colônias de cada amostra foi realizada por PCR e posterior eletroforese em gel de agarose. Na Figura 16, está representada a proporção de clones positivos e negativos resultantes, classificados a partir da comparação dos produtos amplificados com a amplificação do vetor pG8SAET vazio. Foram analisadas 9 colônias de cada amostra; a amostra VDL 1:3 apresentou 100% de colônias com inserto (9/9 colônias), enquanto que as amostras VDL 1:6 e VDL 1:1 apresentaram 89% (8/9 colônias) e 67% (6/9

colônias) de clones positivos, respectivamente. Colônias das amostras controles VD e VDL (Vetor Digerido sem ou com Ligase, respectivamente) também foram analisadas e, assim como esperado para o vetor pG8SAET vazio, sua amplificação resultava em um produto de 173 pb, tamanho utilizado para a comparação das amplificações a partir de colônias das amostras com inserto (VDL 1:1, VDL 1:3 e VDL 1:6).

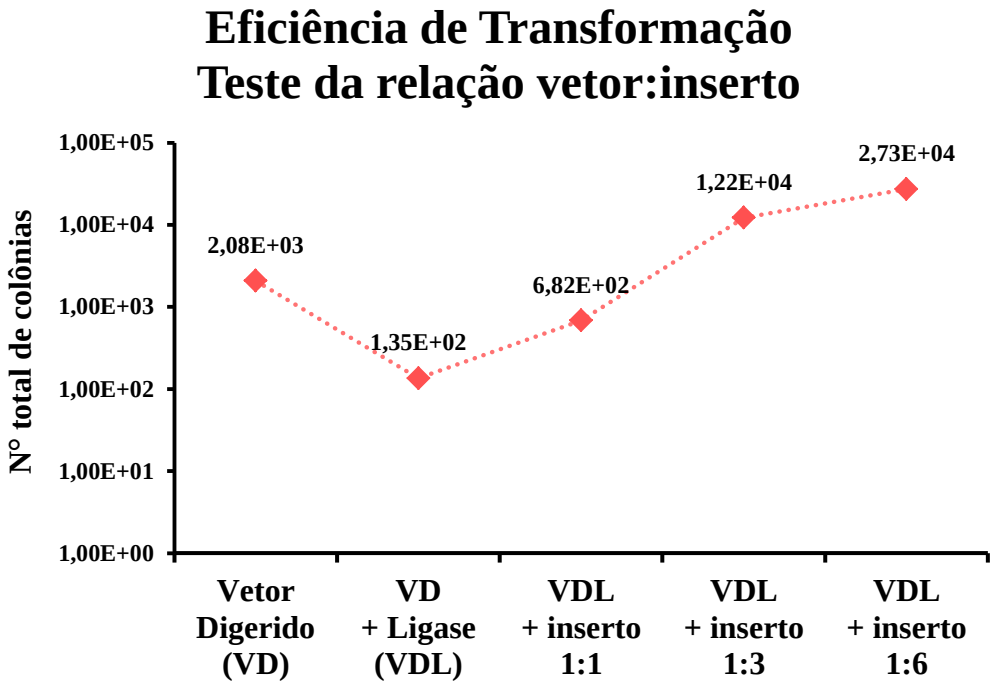


Figura 15. Padronização para a construção de bibliotecas com a técnica de ligação *blunt-end*. Gráfico apresentando a comparação da eficiência de transformação entre diferentes razões molares na relação vetor:inserto. As amostras-controle incluem Vetor Digerido (VD) e Vetor Digerido + Ligase (VDL), as quais foram submetidas à ligação sem insertos. As amostras testes VDL + inserto 1:1, VDL + inserto 1:3 e VDL + inserto 1:6 foram submetidas à ligação com relação vetor:inserto de 1:1, 1:3 e 1:6, respectivamente. Os valores plotados correspondem ao número total de colônias resultantes das transformações de bactérias *E. coli* com cada amostra, após as reações de ligação.

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero que permite que as moléculas fiquem mais próximas durante a ligação, aumentando as chances de inserção dos fragmentos no vetor. Entretanto, sua presença diminui a eficiência de transformação, principalmente nas reações de ligação estendidas (16h). Por esta razão, a presença ou ausência de PEG 4000 também foi analisada nas reações de ligação. Para esta padronização, o vetor pG8SAET foi submetido a

duas reações de digestão com SnaBI, a razão molar foi fixada em 1:5 na relação vetor:inserto e foram utilizados 2.400 U da enzima T4 DNA ligase/µg de vetor.

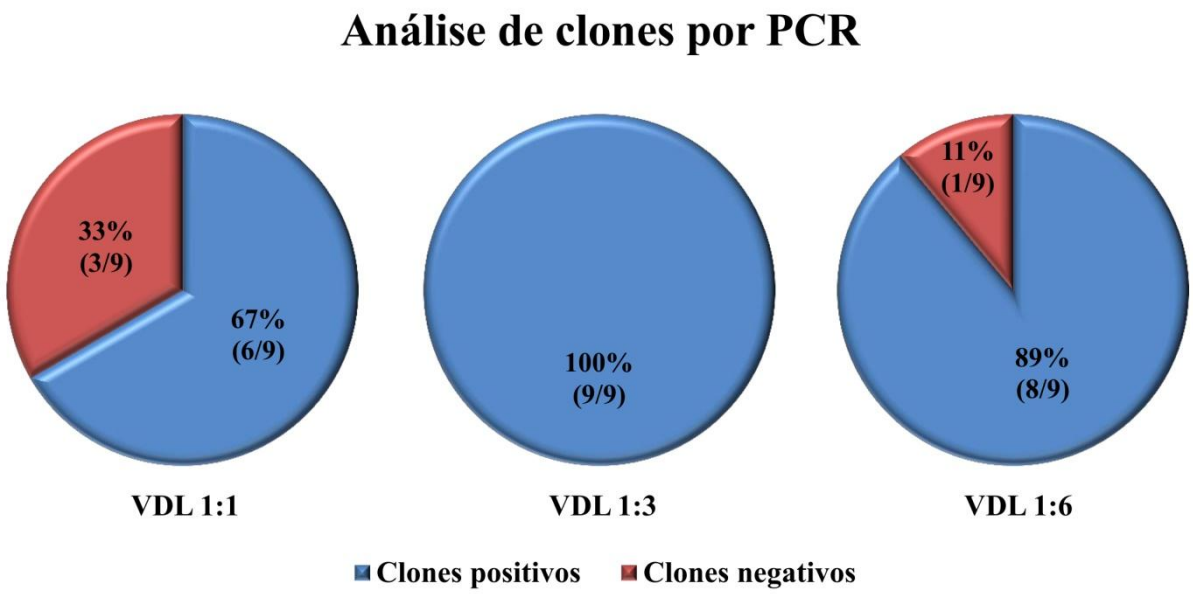


Figura 16. Padronização para a construção de bibliotecas com a técnica de ligação *blunt-end*. Gráficos apresentando a análise de colônias a partir das razões molares utilizadas (relação vetor:inserto 1:1, 1:3 e 1:6). Os valores plotados correspondem à proporção de clones positivos e negativos, resultantes de PCR com 9 colônias para cada amostra. A classificação dos clones foi baseada na análise dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose. As amostras foram consideradas positivas quando apresentavam banda maior que o controle negativo, representado pela amplificação do vetor pG8SAET vazio.

As amostras com e sem PEG apresentaram valores totais de colônias semelhantes, sendo que a amostra sem PEG (VDL 1:5) apresentou um número total de colônias 1,6 vezes maior (Figura 17). Mesmo com as alterações no tratamento do vetor pG8SAET, a presença de vetor vazio ainda se mostrou marcante, com a amostra VDL (Vetor Digerido + Ligase e sem insertos) apresentando número de colônias apenas 4 vezes menor que a amostra VDL 1:5.

A Figura 18 mostra a análise das amostras por PCR de colônias, em que a proporção de clones positivos e negativos foi determinada a partir dos produtos amplificados e posterior eletroforese em gel de agarose. Foram analisadas 9 colônias de cada amostra; a amostra VDL

1:5 PEG apresentou 89% de colônias com inserto (8/9 colônias), enquanto que a amostra VDL 1:5 apresentou 67% de clones positivos (6/9 colônias).

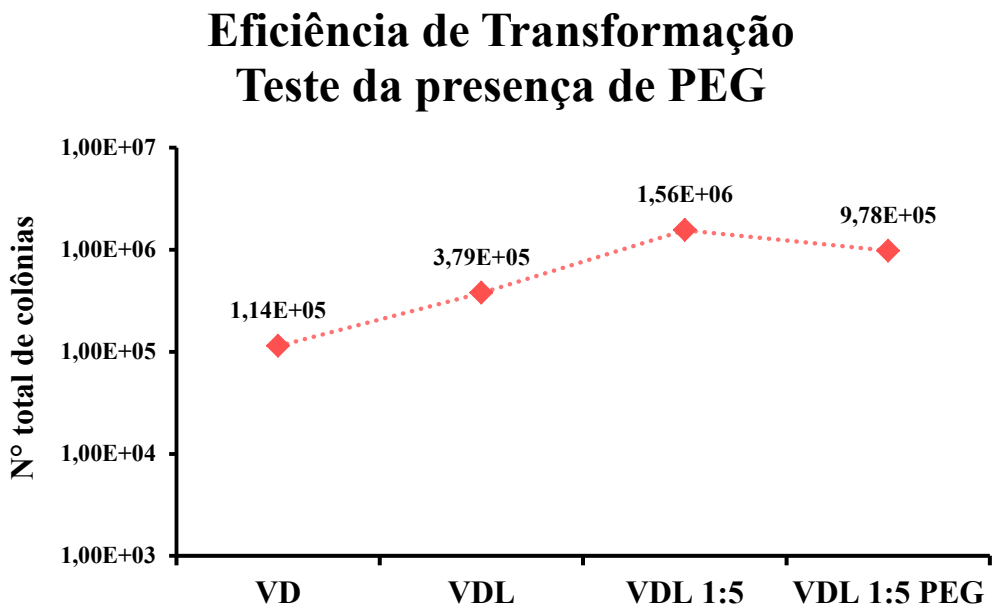


Figura 17. Padronização para a construção de bibliotecas com a técnica de ligação *blunt-end*. Gráfico apresentando a comparação da eficiência de transformação na presença ou ausência de polietilenoglicol (PEG 4000) em reações de ligação. As amostras-teste VDL 1:5 e VDL 1:5 PEG foram submetidas à ligação com relação vetor:inserto 1:5 na ausência ou presença de PEG, respectivamente. As amostras-controle VD (Vetor Digerido) e VDL (Vetor Digerido + Ligase) submetidas à ligação sem insertos estão representadas. Os valores plotados correspondem ao número total de colônias resultantes das transformações de bactérias *E. coli* com cada amostra, após as reações de ligação.

A partir das padronizações, foram estabelecidas as melhores condições para a construção de bibliotecas com a técnica de ligação *blunt-end*. Apesar das análises por PCR de colônias, a diferença entre o número de clones positivos nas amostras VDL 1:3 e VDL 1:6 foi mínima (Figura 16). Adicionalmente, a presença de PEG pode diminuir a eficiência de transformação nas reações de ligação. Por estas razões, as melhores condições foram baseadas no critério de maior eficiência de transformação e, portanto, as reações com maiores relações vetor:inserto (VDL 1:5 e 1:6) e na ausência de PEG foram consideradas para a construção de bibliotecas.

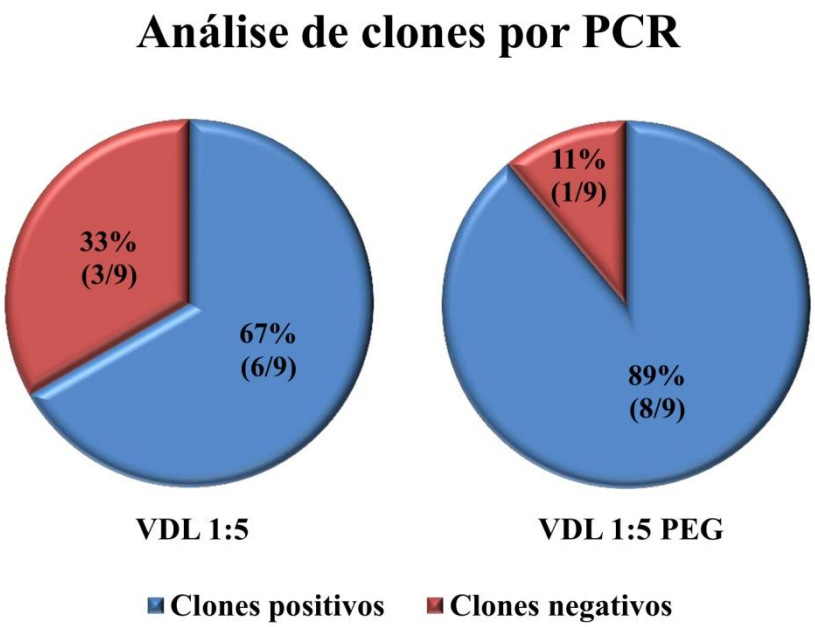


Figura 18. Padronização para a construção de bibliotecas com a técnica de ligação *blunt-end*. Gráficos apresentando a análise de colônias das reações de ligação na ausência ou presença de polietilenoglicol (PEG 4000). Os valores plotados correspondem à proporção de clones positivos e negativos, resultantes de PCR com 9 colônias para cada amostra. A classificação dos clones foi baseada na análise dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram banda maior que o controle negativo, representado pela amplificação do vetor pG8SAET vazio.

4.2. Técnicas alternativas para a construção de bibliotecas

A técnica de ligação *blunt-end* é a principal estratégia adotada para realizar *shotgun phage display*, utilizando o vetor pG8SAET. Entretanto, importantes limitações foram encontradas com esta técnica, principalmente envolvendo a expressiva presença de vetores vazios após as reações de ligação. Portanto, foram testadas técnicas alternativas baseadas no método de ligação com extremidades coesivas, na tentativa de aumentar a eficiência das reações de ligação. As técnicas alternativas incluíram a obtenção de ORESTES ("*Open Reading frame Expressed Sequence Tags*") e a utilização de adaptadores para a ligação, as quais foram testadas e padronizadas paralelamente aos experimentos com a ligação *blunt-end*.

4.2.1. Padronização da obtenção de ORESTES

A obtenção de ORESTES foi testada em conjunto com o aluno de doutorado André A. R. Teixeira e suas amostras de DNA genômico de *Trypanossoma cruzi*. As padronizações realizadas visavam o padrão em arraste dos fragmentos genômicos amplificados por PCR, em análises por eletroforese em gel de agarose. Desta forma, alterações nos parâmetros de PCR foram analisadas em diversos testes, a fim de atingir este objetivo.

Inicialmente, um conjunto de oligonucleotídeos com sequência aleatória e portando um sítio de restrição para a enzima HindIII foi gerado (Figura 8B da seção Material e Métodos), e apenas três deles foram empregados para os testes iniciais. Amplificações com um único oligonucleotídeo ou com combinações entre eles foram testadas, resultando em maior número de amplificações quando os oligonucleotídeos eram combinados entre si. Em paralelo, a temperatura de pareamento durante os ciclos de PCR foi analisada, onde foram aplicadas baixas temperaturas (37°C e 25°C) para reduzir a possível especificidade dos oligonucleotídeos utilizados por algumas sequências no genoma. A temperatura de 25°C foi escolhida por resultar em maior número de amplificações a partir dos oligonucleotídeos (dados não apresentados).

Componentes adicionados na PCR e suas respectivas concentrações também foram avaliadas. O efeito da presença de DMSO nas reações foi verificado, por impedir a formação de estruturas secundárias no DNA molde e nos oligonucleotídeos, as quais podem interferir na PCR (CHAKRABARTI & SCHUTT, 2001); entretanto, sua presença não alterou o padrão das amplificações por eletroforese em gel de agarose. Uma maior concentração da enzima Taq polimerase foi utilizada (5 U/por reação), o que contribuiu para um aumento do padrão em arraste das amplificações. Concentrações crescentes de dNTPs (deoxinucleotídeos trifosfatados) e de $MgCl_2$ também foram analisadas, resultando em amplificações com maior arraste quando foram adicionados 250 µM de dNTPs (quantidade semelhante à utilizada em

PCR padrão) e 5 mM de $MgCl_2$ (maior concentração testada) (dados não apresentados). Altas concentrações de $MgCl_2$ na PCR favorecem amplificações não-específicas, as quais são desejadas para a obtenção de ORESTES.

As padronizações realizadas resultaram em um padrão de arraste pelas amostras testadas. Contudo, também era desejado que o tamanho médio dos fragmentos resultantes para clonagem fosse de 300-500 pb, mas o tamanho mínimo apresentado pelas amplificações foi de ~650 pb. A fim de diminuir o tamanho médio dos produtos amplificados, um ciclo diferente de PCR foi empregado, o qual foi desprovido do passo de extensão durante os 35 ciclos de amplificação. A Figura 19 reúne as melhores condições determinadas pelas padronizações (5 U da enzima Taq polimerase, 5 mM de $MgCl_2$ e 25°C como temperatura de pareamento), comparando a amplificação com a PCR 1 (com desnaturação, pareamento e extensão nos ciclos de amplificação) e com a PCR 2 (ciclos apenas com desnaturação e pareamento) (Figura 8C da seção Material e Métodos). A utilização da PCR 2 se mostrou eficiente para reduzir o tamanho médio dos fragmentos. Porém, apesar dos esforços aplicados, não foi possível obter amplificações com o padrão de arraste desejado. Seria necessário que as amostras apresentassem um arraste contínuo, sem bandas delimitadas, diminuindo as chances de favorecer alguns fragmentos sobre outros e garantindo a construção de uma biblioteca genômica mais completa.

É importante ressaltar que estes resultados poderiam ser diferentes no caso do DNA genômico de *L. interrogans*, já que este possui número reduzido de regiões repetitivas em comparação ao DNA genômico de *T. cruzi*. Apesar disto, esta abordagem foi descontinuada com o intuito de testar a eficiência de outras técnicas.

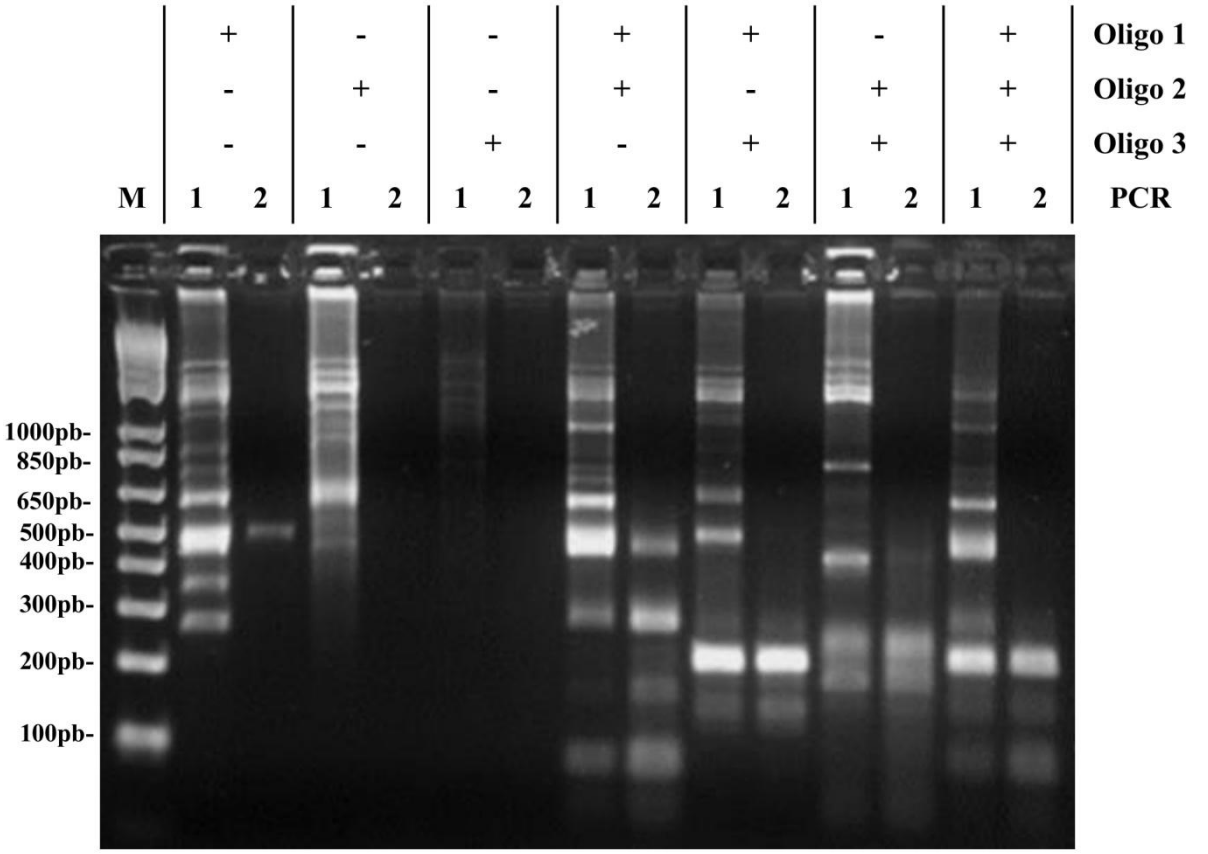


Figura 19. Padronização para a construção de bibliotecas a partir da obtenção de ORESTES. Eletroforese em gel de agarose comparando oligonucleotídeos com sequências aleatórias e diferentes ciclos de PCR. A presença ou ausência dos oligonucleotídeos (Oligo 1, Oligo 2 e Oligo 3) estão especificadas como + ou -, respectivamente. Os números 1 e 2 correspondem aos ciclos de PCR 1 e PCR 2 utilizados, os quais estão especificados na Figura 8C da seção Material e Métodos. O gel contém 1% de agarose e foi corado com brometo de etídio, sendo posteriormente analisado sob luz UV. **M-** Marcador 1kb plus DNA Ladder (Life Technologies®).

4.2.2. Ligação com a utilização de adaptadores

Outro método avaliado para a construção de bibliotecas foi o uso de adaptadores em grampo nas reações de ligação (Figura 9 da seção Material e Métodos). A técnica foi testada com fragmentos de DNA genômico de *L. interrogans* e com o vetor pG8NHP, fagomídeo derivado do pG8SAET. Os fragmentos de DNA genômico foram submetidos a várias reações, incluindo *blunting*, fosforilação, ligação de adaptadores em suas extremidades, tratamento com as enzimas ExoIII e ExoI, e a posterior digestão com a enzima HindIII para a inserção no vetor pG8NHP. Paralelamente, reações de ligação *blunt-end* também foram realizadas para a

comparação dos resultados. Os dois vetores utilizados, pG8NHP e pG8SAET, foram digeridos e defosforilados duas vezes, a fim de evitar a presença de vetores vazios após a ligação. Três razões molares diferentes (1:1, 1:3 e 1:6) na relação vetor:inserto foram testadas para as ligações com adaptadores, enquanto que as reações de ligação *blunt-end* foram realizadas com razões molares de 1:1 e 1:6.

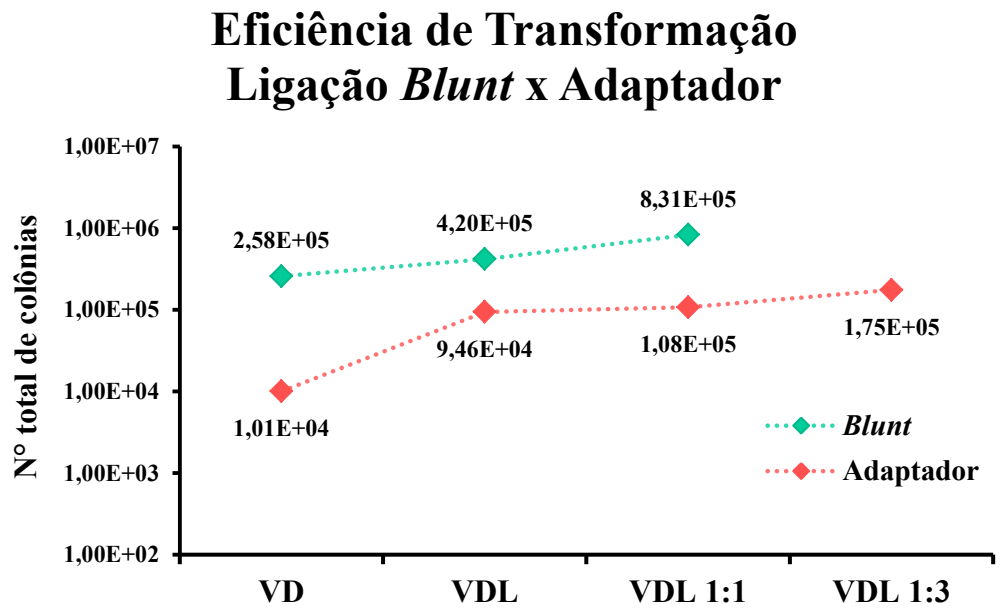


Figura 20. Padronização para a construção de bibliotecas com a técnica de ligação com adaptadores. Gráfico apresentando a comparação da eficiência de transformação entre a ligação *blunt-end* e a ligação com adaptadores, as quais foram realizadas com os vetores pG8SAET e pG8NHP, respectivamente. As amostras-teste VDL 1:1 e VDL 1:3 foram submetidas à ligação com relação vetor:inserto 1:1 e 1:3, respectivamente. As amostras-controle VD (Vetor Digerido) e VDL (Vetor Digerido + Ligase) submetidas à ligação sem insertos estão representadas. Os valores plotados correspondem ao número total de colônias resultante da transformação de bactérias *E. coli* com cada amostra, após as reações de ligação.

A Figura 20 mostra o número de colônias resultante para cada amostra após a transformação de bactérias, comparando as técnicas de ligação *blunt-end* e de ligação com adaptadores. Devido a problemas durante a transformação, não foi possível analisar a amostra VDL 1:6 ligada com adaptadores e, portanto, somente foi possível comparar as amostras com razão molar 1:1 (VDL 1:1), resultantes das duas técnicas realizadas. As amostras de ligação

blunt-end apresentaram maior eficiência de transformação do que as amostras com adaptadores, sendo observada uma diferença de 7,7 vezes entre as amostras VDL 1:1. É possível observar também que a digestão do vetor pG8NHP foi claramente mais eficiente do que a digestão do vetor pG8SAET. A diferença entre as amostras controles VD (Vetor Digerido sem ligase e sem insertos) foi de 25,5 vezes. Isto se deve provavelmente à maior eficiência de digestão da enzima HindIII sobre a enzima SnaBI.

Algumas colônias das amostras de ligação com adaptadores foram testadas por PCR para verificar a presença de insertos. Contudo, nenhuma das colônias coletadas foi considerada como clone positivo, indicando que houve alto enriquecimento de vetores vazios durante a transformação (dados não apresentados). Isto pode ser explicado pela presença marcante de vetores vazios nas amostras VDL (Vetor Digerido + Ligase e sem insertos) em ambas as estratégias comparadas, sugerindo que a defosforilação dos vetores continuava sendo insuficiente (Figura 20).

4.3. Construção e validação das bibliotecas BBT1, BBT2 e BBT3

Apesar de suas limitações, a estratégia de ligação *blunt-end* para a construção de bibliotecas foi mais eficiente do que as técnicas alternativas testadas e, portanto, ela foi adotada para a construção de bibliotecas em maior escala, com a finalidade de selecionar possíveis adesinas de leptospiras. Foram construídas três bibliotecas no total, denominadas BBT1, BBT2 e BBT3.

O tamanho médio dos fragmentos de DNA genômico estabelecido para as bibliotecas foi de 400 pb; este tamanho é adequado para que as proteínas recombinantes obtidas pelas clonagens resultem em proteínas pVIII viáveis para apresentação na superfície de bacteriófagos. Considerando também a extensão do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (aproximadamente 4,6 Mb), a probabilidade de inserção

correta dos insertos (1/18) e uma cobertura suficiente do genoma (100 vezes), o número mínimo ideal de clones válidos para as bibliotecas seria de $2,07x10^7$ clones.

A primeira biblioteca (BBT1) foi construída através da estratégia de ligação *blunt-end* com relação vetor:inserto de 1:6, a partir de 7,5 µg do vetor pG8SAET, e na ausência de PEG. Após a transformação de bactérias DH10B, uma alíquota da cultura foi separada e adicionada a placas de cultura para a análise do número de colônias resultantes e determinação da eficiência de transformação. A Figura 21 (barra à esquerda) mostra que a eficiência de transformação para a BBT1 foi de $1,3x10^6$ clones, representando uma cobertura do genoma de aproximadamente 6,3 vezes. A análise das colônias foi feita por PCR, com posterior validação por sequenciamento e, das 16 colônias avaliadas, apenas 56% (9/16 amostras) apresentaram insertos (Figura 22, gráfico à esquerda). Com este resultado, a cobertura do genoma para a BBT1 passou para 3,5 vezes ($7,3x10^5$ clones positivos).

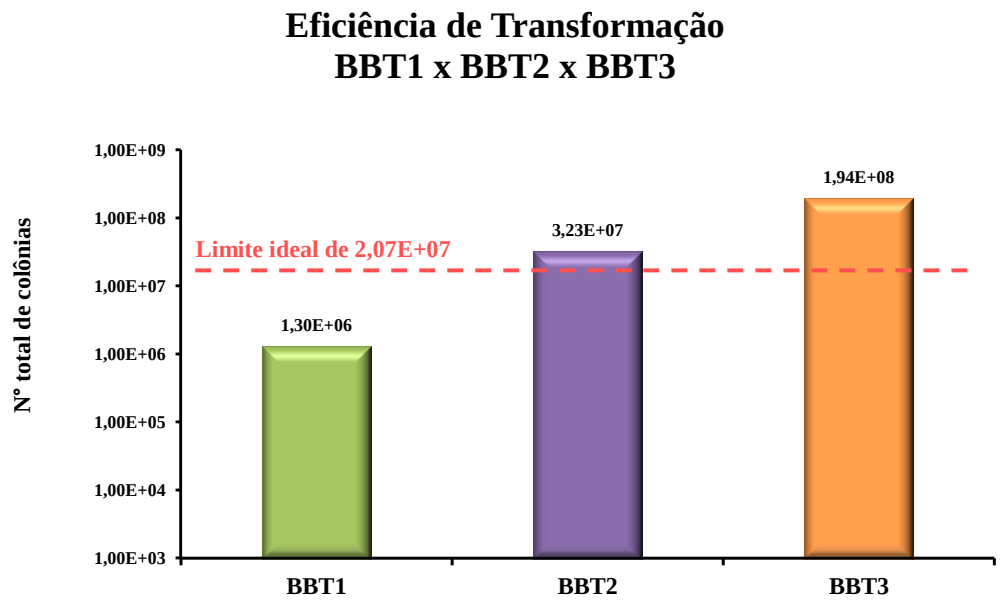


Figura 21. Construção de bibliotecas em maior escala a partir da técnica de ligação *blunt-end*. Gráfico apresentando a comparação da eficiência de transformação entre as bibliotecas construídas: BBT1, BBT2 e BBT3. Os valores plotados correspondem ao número total de colônias resultantes das transformações de bactérias *E. coli* com cada amostra, após as reações de ligação. A linha pontilhada representa o valor mínimo ideal de colônias esperado para a obtenção de bibliotecas com ampla cobertura genômica; detalhes para determinação deste valor se encontram no texto.

Com a finalidade de se obter um número ideal de clones válidos (2,07x10^7 clones), outras duas bibliotecas (BBT2 e BBT3) foram construídas a partir de 10 µg de vetor pG8SAET, através da estratégia de ligação *blunt-end*. A BBT2 foi construída com relação vetor:inserto de 1:6 e na ausência de PEG, enquanto que a BBT3 foi construída com relação vetor:inserto 1:3 e na presença de PEG. Assim como para a BBT1, após a transformação de bactérias com as bibliotecas, uma alíquota de cada cultura foi separada para a análise do número de colônias totais e da eficiência de transformação. As bactérias *E. coli* TG1 competentes utilizadas para a transformação com as novas bibliotecas possuíam eficiência de transformação superior à DH10B usada para a BBT1 (10^9 UFC/µg de DNA contra 10^8 UFC/µg de DNA; ver item 3.2 da seção Material e Métodos) e, consequentemente, era esperada maior eficiência de transformação com BBT2 e BBT3.

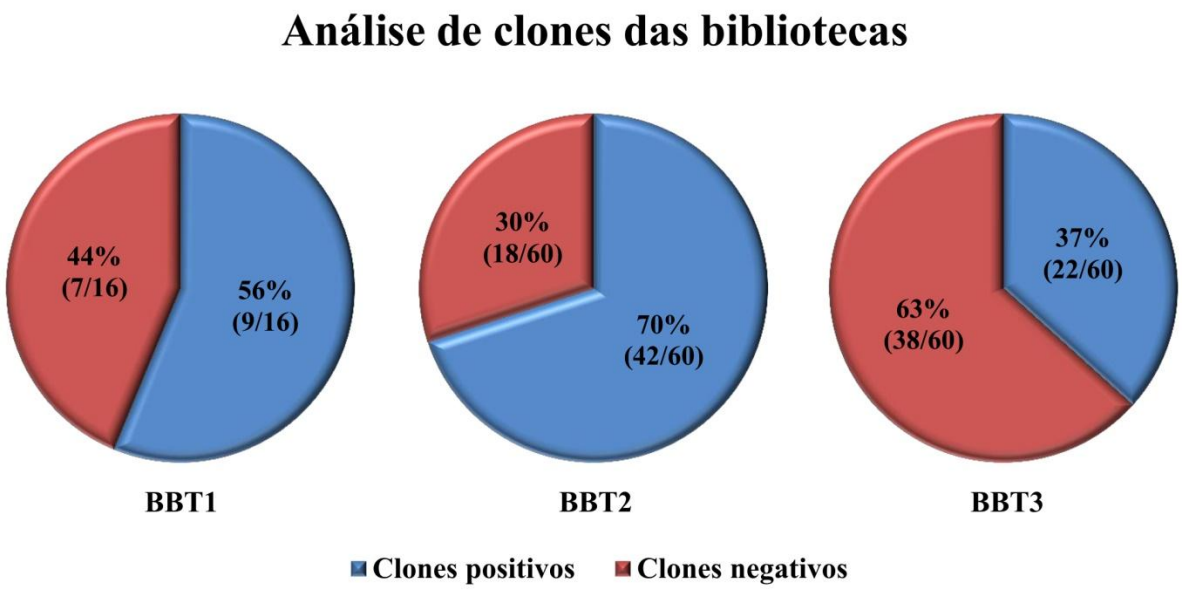


Figura 22. Construção de bibliotecas em maior escala a partir da técnica de ligação *blunt-end*. Gráficos apresentando a análise de colônias a partir das três bibliotecas construídas (BBT1, BBT2 e BBT3). Os valores plotados correspondem à proporção de clones positivos e negativos, resultantes da PCR de colônias para cada amostra (16 colônias para BBT1 e 60 colônias para BBT2 e BBT3), as quais foram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

Na Figura 21 (barras central e à direita) também está representada a eficiência de transformação para as bibliotecas BBT2 e BBT3, as quais apresentaram $3{,}23x10^7$ e $1{,}94x10^8$ clones, respectivamente. Colônias resultantes das duas bibliotecas foram coletadas para análise por PCR e validação por sequenciamento. A partir das 60 colônias avaliadas para cada biblioteca, 70% das amostras da BBT2 apresentaram insertos, enquanto que, para as amostras da BBT3, a proporção de clones positivos foi de apenas 37% (Figura 22, gráficos central e à direita). Estes resultados representam uma cobertura do genoma de 109 vezes para a BBT2 e de 347 vezes para a BBT3 ($2{,}26x10^7$ e $7{,}18x10^7$ clones, respectivamente).

4.4. *Biopanning* e técnica BRASIL

4.4.1. *Biopanning*-BRASIL da biblioteca 1 (BBT1)

A BBT1 foi a primeira biblioteca construída e, mesmo que tenha apresentado uma cobertura do genoma bem abaixo da ideal, ela foi utilizada para a realização de um primeiro *biopanning* através da técnica BRASIL, a fim de selecionar possíveis fragmentos de interesse expostos em fagos recombinantes. O *biopanning* consistiu em quatro rodadas de seleção em células LEC (células endoteliais de pulmão, originadas de camundongos).

Alíquotas foram coletadas após cada rodada de seleção e adicionadas a placas de cultura para avaliar o número de fagos ligados às células (fagos *Output*). As colônias resultantes foram amplificadas por PCR e analisadas por eletroforese em gel de agarose. Foram coletadas 24 colônias de cada rodada (*Output 1-4*), das quais 91,7% no Output 1 (22/24 colônias), 79,2% no Output 2 (19/24 colônias), 70,8% no Output 3 (17/24 colônias) e apenas 33,3% no Output 4 (8/24 colônias) apresentaram insertos, respectivamente (Figura 23). Ao contrário do esperado, a proporção de clones considerados positivos diminuiu ao longo das coletas, sugerindo que vetores vazios estavam sendo enriquecidos, principalmente na última rodada (*Output 4*).

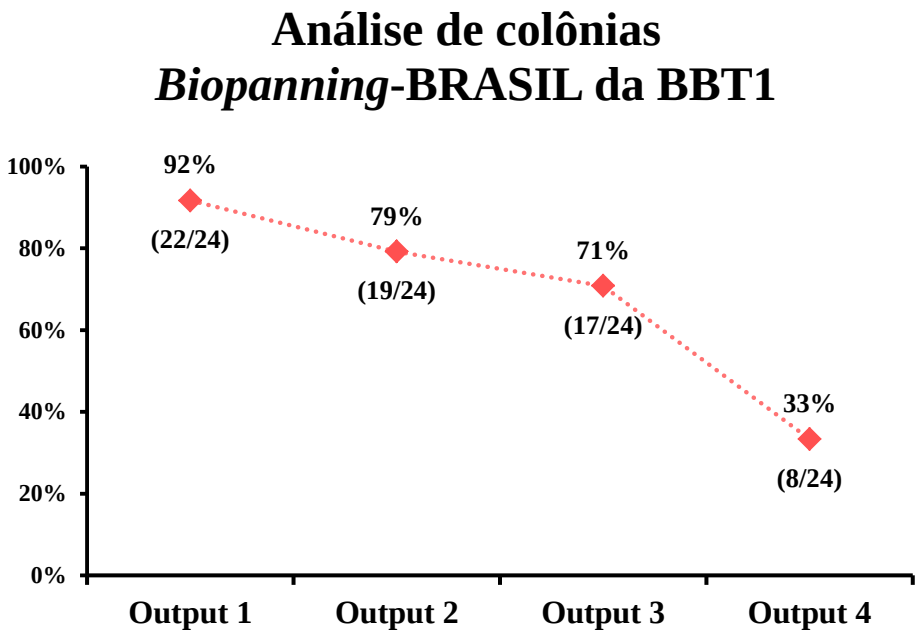


Figura 23. *Biopanning*-BRASIL da biblioteca BBT1 em células endoteliais pulmonares (LEC). Gráfico apresentando a comparação de colônias positivas a partir dos fagos ligados às células LEC (fagos *Output*), coletados nas quatro rodadas de seleção. Os valores plotados correspondem à proporção de clones positivos resultantes de PCR com 24 colônias para cada rodada (*Output 1-4*). A classificação dos clones foi baseada na análise dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram banda maior que o controle negativo, representado pela amplificação do vetor pG8SAET vazio.

As amostras consideradas positivas pela PCR de colônias tiveram seu DNA extraído para a validação por sequenciamento, e as amostras sequenciadas foram posteriormente analisadas pelas ferramentas EMBOSS Transeq e BLASTx. A Figura 24 mostra a proporção e a classificação dos clones resultantes, em que a maioria deles possuía inserto fora de fase ou eram vetores vazios. Não havia clones em fase com a sequência sinal e com a proteína capsidial pVIII (*Positivos*), mas foram encontrados quatro clones em fase somente com a pVIII (3,9%, *Em fase com pVIII*), os quais foram denominados Fagos 1.2, 2.9, 2.23 e 3.16.

As proteínas de *L. interrogans* cujas sequências estavam presentes nos quatro clones foram submetidas à análise em programas de predição para a identificação de peptídeo sinal e região transmembrana em suas sequências, e a possível localização subcelular. As

características encontradas para cada proteína estão reunidas na Tabela 7, sendo arbitrários os nomes citados para cada proteína de *L. interrogans*.

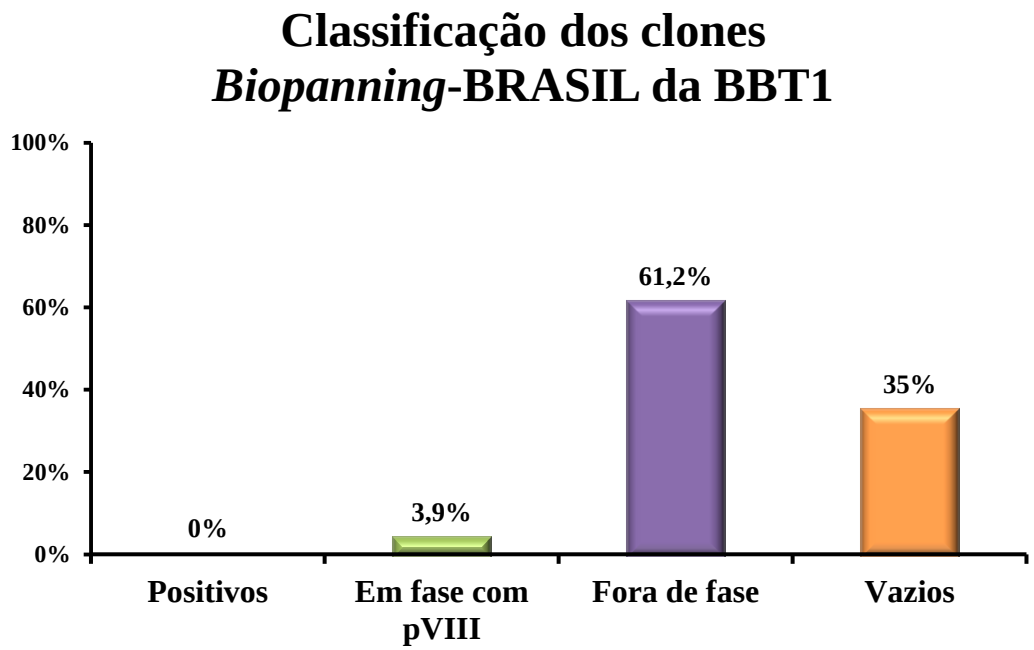


Figura 24. *Biopanning*-BRASIL da biblioteca BBT1 em células endoteliais pulmonares (LEC). Gráfico apresentando a classificação dos clones após análise por sequenciamento das colônias positivas (por PCR), obtidas nas quatro rodadas de seleção. A classificação foi baseada na análise das sequências de *L. interrogans* apresentadas pelos fagos, a partir da análise das seis fases de leitura possíveis (EMBOSS Transeq) e de alinhamento (BLASTx). Os valores plotados correspondem à proporção de clones positivos (em fase com a sequência sinal e a pVIII), em fase com a pVIII (mas fora de fase com a sequência sinal), fora de fase e vazios (vetores pG8SAET vazios).

Apenas a proteína presente no Fago 1.2 (LepA180) foi classificada como secretada pela bactéria. Esta proteína é hipotética e não possui função conhecida até o momento, podendo apresentar algum papel durante a infecção de leptospiras no hospedeiro. Entretanto, sua localização subcelular não foi confirmada por outros programas de predição (Tabela A1 da seção Apêndices) e, portanto, foi decidido testar outras bibliotecas com melhor qualidade para a identificação de novas proteínas.

Tabela 7

Análise das proteínas de *L. interrogans* cujas sequências estão em fase com pVIII, a partir do *biopanning*-BRASIL da BBT1. As predições de peptídeo sinal, região transmembrana e localização subcelular foram realizadas pelos programas *Phobius, TMHMM* e *LocTree3*, respectivamente.

Fago	Nome da proteína	Peptídeo sinal	Região transmembrana	Localização subcelular (%)
1.2	LepA180	Sim	Não	**Secretada (93%)**
2.9	LepA176	Não	Sim	Membrana interna (89%)
2.23	LepA658	Não	Não	Membrana interna (89%)
3.16	LepA692	Não	Sim	Membrana interna (88%)

4.4.2. *Biopanning*-BRASIL da biblioteca 2 (BBT2)

As novas bibliotecas construídas (BBT2 e BBT3) apresentaram eficiência maior que a desejada ($2{,}07 \times 10^7$ clones), principalmente a BBT3 e, após a validação de colônias das bibliotecas, a BBT3 continuou apresentando número elevado de clones válidos e ampla cobertura do genoma de *L. interrogans*, sendo características interessantes para o *biopanning*. Por outro lado, a proporção de clones negativos se mostrou consideravelmente alta na BBT3 (ver item 4.3 desta seção). Visto que a BBT2 apresentou o número mínimo desejado de clones válidos e proporção menor de clones negativos, esta foi escolhida para ser avaliada em um segundo *biopanning* através da técnica BRASIL.

Ao contrário do *biopanning* realizado com a BBT1, o *biopanning* com a BBT2 foi realizado em células epiteliais renais (células Vero, originadas de macacos) e com apenas três rodadas de seleção (ver item 3.11.2 da seção Material e Métodos). Assim como para a BBT1, alíquotas foram coletadas após cada rodada de seleção para avaliar o número de fagos ligados

às células (fagos *Output*), e as colônias resultantes foram amplificadas por PCR e analisadas por eletroforese em gel de agarose. Grande parte das colônias coletadas em cada rodada (*Output 1-3*) possuía inserto, sendo 87,5% no Output 1 (35/40 colônias), 92,5% no Output 2 (37/40 colônias) e 95% no Output 3 (38/40 colônias). Portanto, houve pouco enriquecimento de vetores vazios ao longo das rodadas de seleção, em comparação com a análise do *biopanning* da BBT1 (Figura 25).

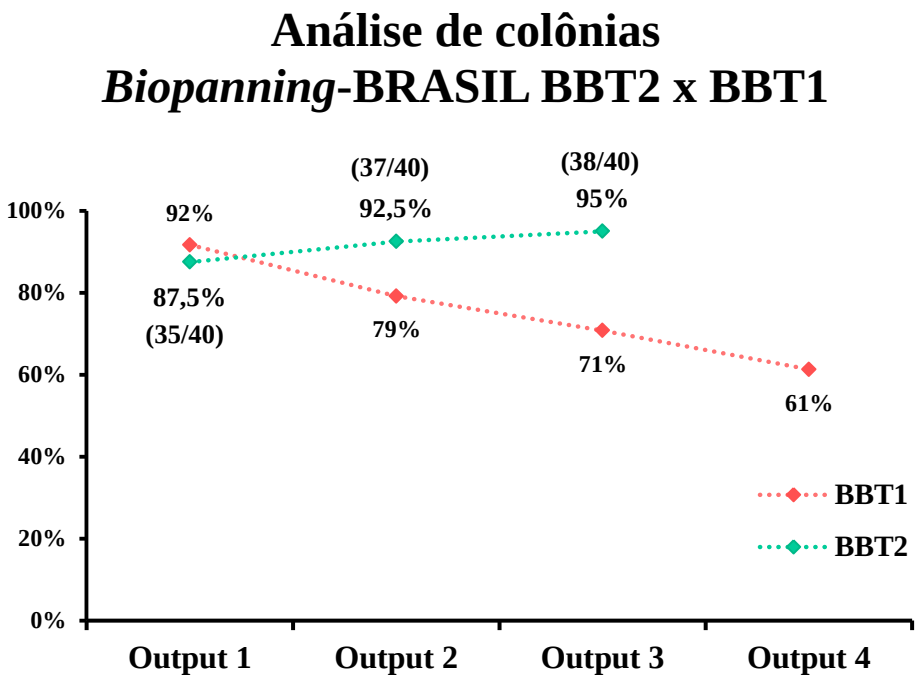


Figura 25. *Biopanning*-BRASIL da biblioteca BBT2 em células epiteliais renais (Vero). Gráfico apresentando a comparação de colônias positivas a partir dos fagos ligados às células Vero (fagos *Output*), coletados nas três rodadas de seleção. Os valores plotados correspondem à proporção de clones positivos resultantes de PCR com 40 colônias para cada rodada (*Output 1-3*). A classificação dos clones foi baseada na análise dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram banda maior que o controle negativo, representado pela amplificação do vetor pG8SAET vazio. Os dados obtidos pelo *biopanning*-BRASIL da biblioteca BBT1 estão incluídos para comparação adicional, ainda que tenham sido obtidos com células LEC.

As amostras consideradas positivas pela PCR de colônias foram submetidas à validação por sequenciamento e as amostras sequenciadas foram posteriormente analisadas pelas ferramentas EMBOSS Transeq e BLASTx. A Figura 26 mostra a classificação dos

clones resultantes e, apesar de ser obtido por *biopanning* em outro tipo celular, o resultado com as amostras da BBT1 também está representado para uma comparação relativa. A maioria dos clones da BBT2 possuía insertos fora de fase, porém, poucos clones eram vetores vazios, ao contrário das amostras da BBT1. Foi encontrado apenas um clone em fase com a sequência sinal e a pVIII (1%, *Positivos*), mas também foram encontrados dois clones em fase apenas com a sequência sinal (2,1%, *Fase com seq. sinal*) e nove clones em fase apenas com a pVIII (9,3%, *Fase com pVIII*). Os clones em fase com a sequência sinal e/ou pVIII foram pré-selecionados para a análise mais detalhada de suas sequências, sendo denominados como Fagos 1.3, 1.7, 1.36, 2.10, 2.13, 2.21, 3.10, 3.21, 3.25, 3.35 e 3.36.

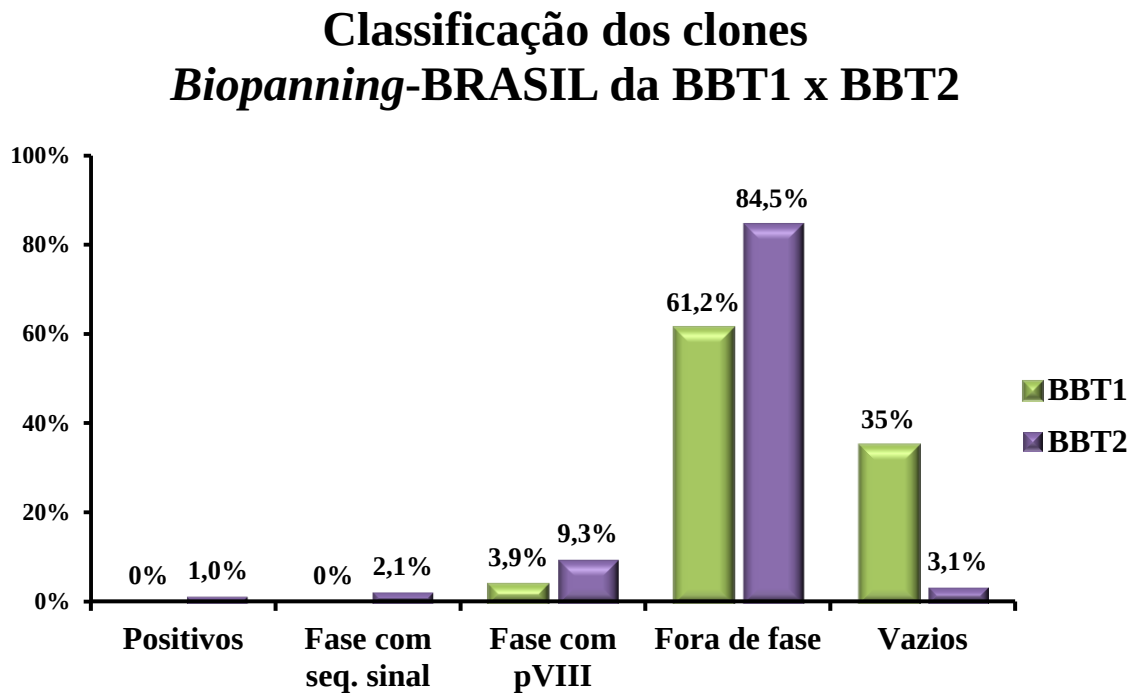


Figura 26. *Biopanning*-BRASIL da biblioteca BBT2 em células epiteliais renais (Vero). Gráfico apresentando a classificação dos clones após análise por sequenciamento das colônias positivas (por PCR), obtidas nas três rodadas de seleção. A classificação dos clones foi baseada na análise das sequências de *L. interrogans* apresentadas pelos fagos, a partir da análise das seis fases de leitura possíveis (EMBOSS Transeq) e de alinhamento (BLASTx). Os valores plotados correspondem à proporção de clones positivos (em fase com a sequência sinal e a pVIII), em fase com a sequência sinal (mas fora de fase com a pVIII), em fase com a pVIII (mas fora de fase com a sequência sinal), fora de fase e vazios (vetores pG8SAET vazios). Os dados obtidos pelo *biopanning*-BRASIL da biblioteca BBT1 estão incluídos para comparação, ainda que tenham sido obtidos com células LEC.

Assim como para as amostras da BBT1, as proteínas de *L. interrogans* cujas sequências estavam presentes nos onze clones da BBT2 foram submetidas à análise em programas de predição para a identificação de peptídeo sinal e região transmembrana em suas sequências, e a possível localização subcelular. A Tabela 8 mostra as características encontradas para cada proteína, onde apenas quatro delas foram classificadas como secretadas pela bactéria. As proteínas secretadas estavam presentes nos Fagos 2.10 (LepA962), 3.10 (LepA677), 3.21 (LepA069) e 3.25 (LepA388), sendo arbitrários os nomes citados para cada proteína de *L. interrogans*. Após a verificação das mesmas proteínas por outros programas de predição, a localização subcelular da proteína LepA677 (Fago 3.10) não foi confirmada e, portanto, esta proteína não foi escolhida para futuras análises (Tabela A2 da seção Apêndices).

Tabela 8

Análise das proteínas de *L. interrogans* cujas sequências estão em fase com a sequência sinal e/ou com pVIII, a partir do *biopanning*-BRASIL da BBT2. As predições de peptídeo sinal, região transmembrana e localização subcelular foram realizadas pelos programas *Phobius*, *TMHMM* e *LocTree3*, respectivamente. Em destaque, estão as proteínas expostas na bactéria, por predição.

Classificação dos clones	Fago	Nome da proteína	Peptídeo sinal	Região transmembrana	Localização subcelular (%)
Positivo	**1.3**	LepA483	Não	Não	Citoplasma (89%)
Em fase apenas com a sequência sinal	**2.10**	LepA962	Sim	Não	**Secretada (97%)**
	2.21	LepA035	Não	Não	Citoplasma (98%)
Em fase apenas com a pVIII	**1.7**	LepA159	Não	Não	Citoplasma (98%)
	1.36	LepA872	Não	Não	Membrana interna (89%)

Tabela 8 - Continuação

Classificação dos clones	Fago	Nome da proteína	Peptídeo sinal	Região transmembrana	Localização subcelular (%)
Em fase apenas com a pVIII	**2.13**	LepA351	Sim	Sim	Membrana interna (90%)
	2.21	LepA036	Não	Não	Citoplasma (88%)
	3.10	LepA677	Sim	Não	**Secretada (93%)**
	3.21	LepA069	Não	Sim	**Secretada (91%)**
	3.25	LepA388	Sim	Sim	**Secretada (97%)**
	3.35	LepA294	Não	Não	Citoplasma (98%)
	3.36	LepA096	Não	Não	Citoplasma (97%)

4.5. Análise e clonagem para expressão das proteínas selecionadas a partir do *biopanning*-BRASIL da BBT2

Apesar das três proteínas selecionadas (LepA962, LepA069 e LepA388) estarem presentes em fagos que não foram considerados como clones positivos (em fase com a sequência sinal e a pVIII), elas apresentam características muito interessantes para um estudo mais aprofundado de sua estrutura e possíveis funções.

4.5.1. Proteínas LepA962 (Fago 2.10) e LepA069 (Fago 3.21)

O Fago 2.10 apresentava a lipoproteína hipotética LepA962, a qual estava em fase apenas com a sequência sinal no fago. As lipoproteínas formam uma grande proporção das

proteínas de membrana externa em leptospiras e a maioria dos fatores de virulência identificados até hoje são lipoproteínas. Portanto, esta proteína pode estar envolvida na interação bactéria-hospedeiro e representar uma possível adesina. Segundo a Tabela 8, esta proteína apresenta um peptídeo sinal e após uma análise mais detalhada de sua sequência, foi possível identificar um possível *lipobox* (L V L G C) na extremidade carboxi-terminal do peptídeo sinal, além da presença de um domínio de função desconhecida, denominado *DUF_54*, presente apenas em espécies patogênicas de *Leptospira* (Figura A1 da seção Apêndices). A partir da análise de sua sequência peptídica e da localização da sequência presente no Fago 2.10, foram desenhados oligonucleotídeos para a clonagem de três porções da proteína: a proteína completa sem o peptídeo sinal (*Full*, LepA962F), uma sequência relacionada ao Fago 2.10 (*Phage*, LepA962P) e uma sequência não relacionada ao Fago 2.10 (*Non-Related*, LepA962NR) (Figura A1 da seção Apêndices). Cada sequência foi amplificada por PCR de alta fidelidade para posterior clonagem no vetor de expressão pAE (ver itens 3.12 e 3.13 da seção Material e Métodos).

O Fago 3.21 apresentava a proteína hipotética LepA069, a qual estava em fase apenas com a pVIII no fago. A proteína LepA069 possui uma região transmembrana em sua sequência (Tabela 8), além de apresentar o domínio da superfamília de *AsmA_2*. Este domínio está presente principalmente em espécies patogênicas e intermediárias de *Leptospira*, e é similar à região carboxi-terminal da proteína AsmA em *E. coli*, a qual parece estar envolvida com a correta montagem de proteínas de membrana externa (Figura A2 da seção Apêndices). Curiosamente, outro fago (Fago 1.2) apresentou uma sequência da mesma proteína, mas este foi considerado como um clone fora de fase e não foi considerado para análises adicionais. Apesar desta condição, o Fago 1.2 possuía uma sequência que é sobreposta à sequência presente no Fago 3.21, podendo representar um provável indício de que houve enriquecimento da proteína LepA069 durante as rodadas de seleção com a BBT2. Assim

como para a proteína LepA962, foram desenhados oligonucleotídeos para a clonagem de três porções da proteína LepA069 (LepA069F, LepA069P e LepA069NR), com o objetivo de serem amplificadas por PCR de alta fidelidade e posteriormente clonadas no vetor de expressão pAE (Figura A2 da seção Apêndices).

4.5.2. Proteína LepA388 (Fago 3.25)

O Fago 3.25 também apresentou uma sequência de *L. interrogans* em fase apenas com a pVIII, mas esta sequência originada da proteína LepA388 foi a mais interessante entre todos os fagos. Em uma avaliação inicial, a análise por alinhamento (BLASTx) da sequência presente neste clone resultou em três proteínas alinhadas com alta identidade (LepA388, LepA835 e LepA589). Entretanto, o alinhamento também exibia outras nove proteínas adicionais com identidades ainda consideráveis à sequência do fago. Todas as proteínas foram analisadas pelos mesmos programas de predição e as características encontradas estão detalhadas na Tabela 9.

Tabela 9

Características das primeiras 12 proteínas alinhadas à sequência do Fago 3.25 por BLASTp, apresentando mais de 60% de identidade. As predições de kDa, pI, peptídeo sinal, região transmembrana, localização subcelular e domínios existentes foram realizadas pelos programas *Compute pI/Mw*, *Phobius*, *TMHMM*, *LocTree3* e *SSDB Motif Search*, respectivamente. O domínio de função desconhecida (DUF) comum entre as proteínas está destacado (*vermelho*).

Nome das proteínas	BLASTp *Ident*	nºAA	kDa	pI	Peptídeo sinal	Região transmembrana	Localização subcelular (%)	Domínio(s)
LepA388	**100%**	**631**	**71,8**	**8,54**	**Sim**	**Sim**	**Secretada (97%)**	**DUF_61**
LepA835	100%	631	71,8	6,29	Sim	Sim	Secretada (97%)	**DUF_61**
LepA589	95%	632	71,6	7,13	Sim	Sim	Secretada (98%)	**DUF_61**
LepA934	82%	638	72,5	6,24	Sim	Sim	Secretada (97%)	**DUF_61**

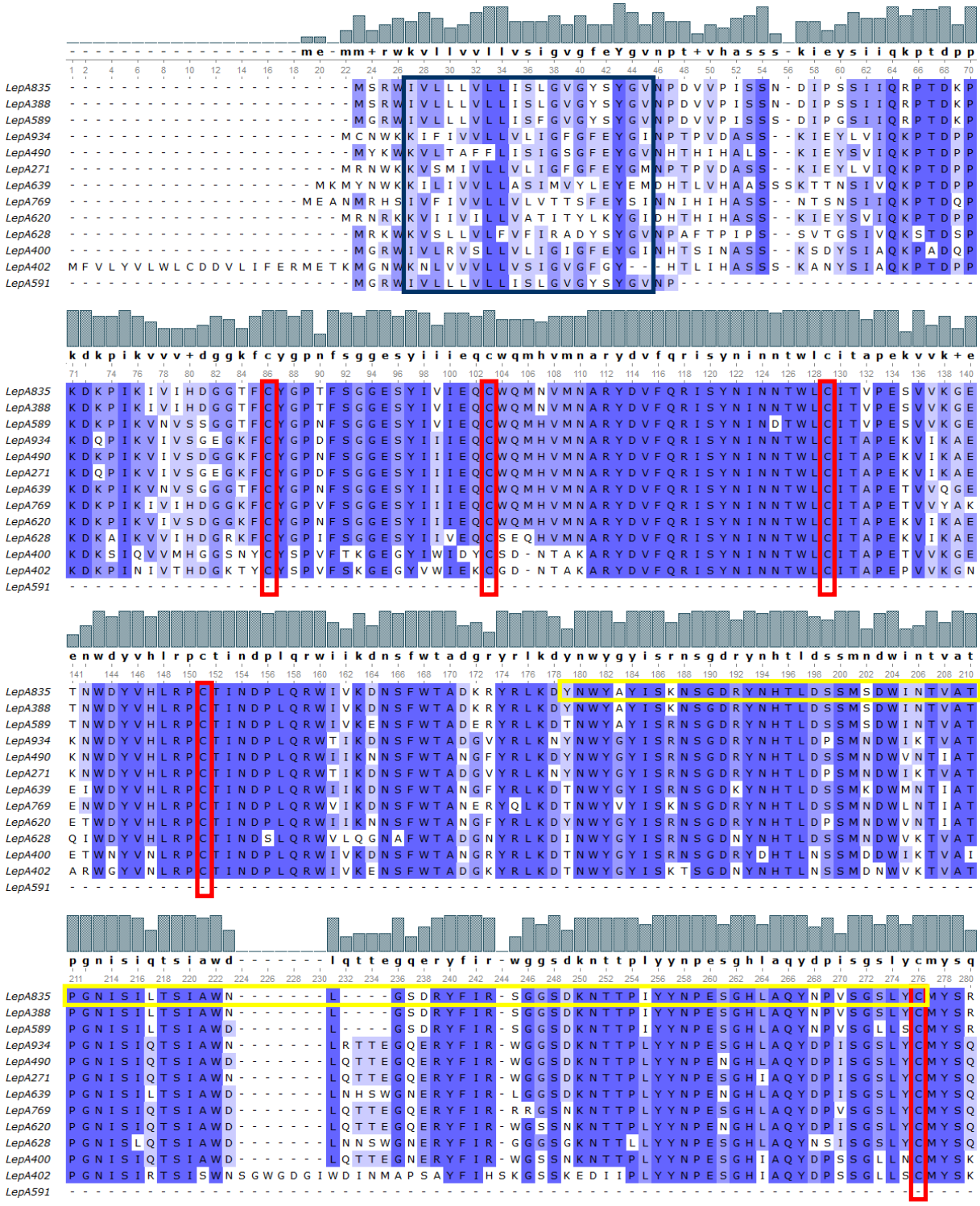
Tabela 9 - Continuação

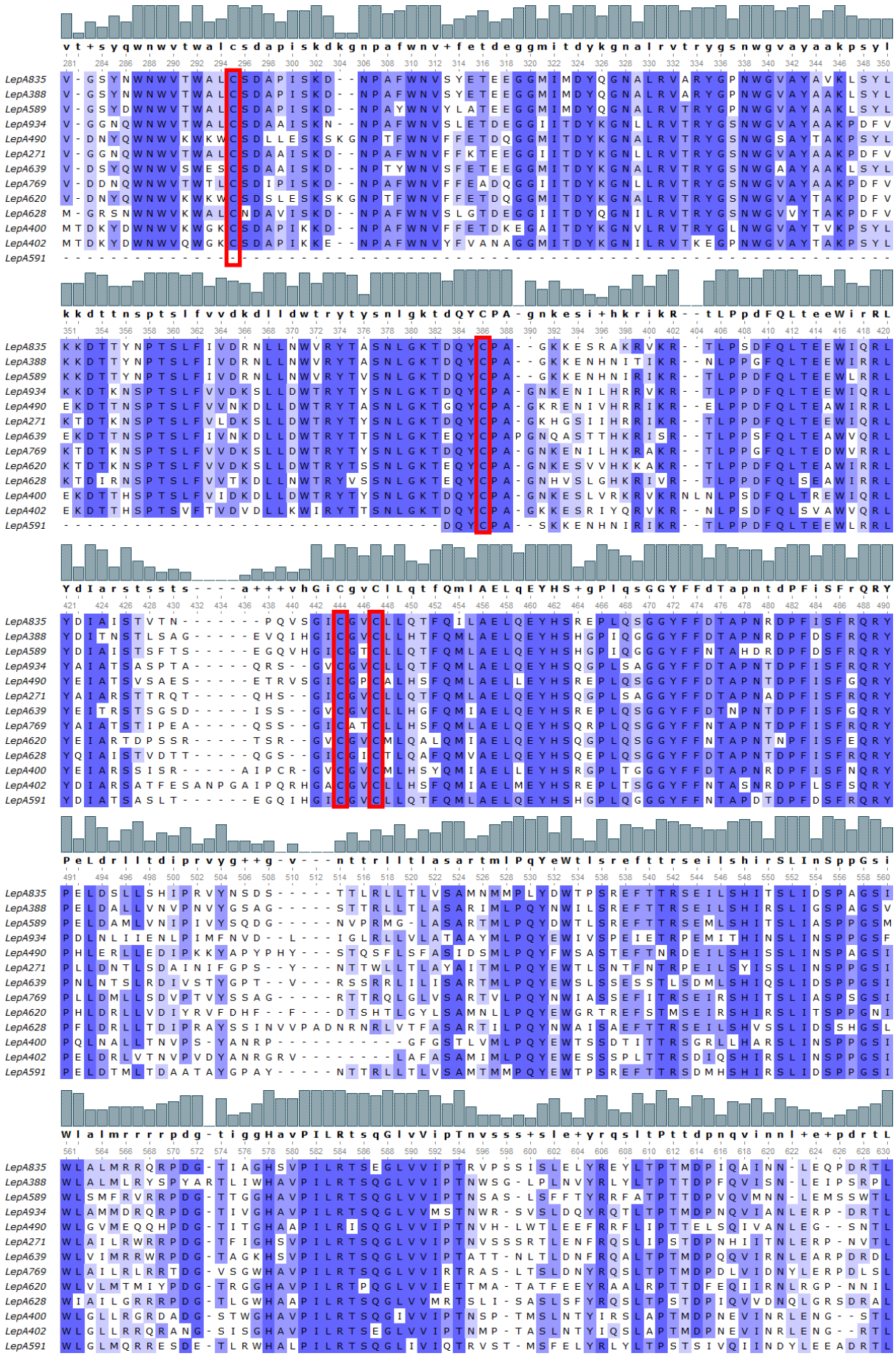
Nome das proteínas	BLASTp *Ident*	nºAA	kDa	pI	Peptídeo sinal	Região transmembrana	Localização subcelular (%)	Domínio(s)
LepA490	80%	639	73,2	6,48	Sim	Não	Secretada (98%)	**DUF_61**
LepA271	81%	636	72,4	7,87	Sim	Sim	Secretada (98%)	**DUF_61**
LepA639	80%	640	72,5	6,37	Sim	Não	Secretada (98%)	**DUF_61**
LepA769	81%	639	73,0	7,56	Sim	Sim	Secretada (98%)	**DUF_61**
LepA620	77%	637	73,1	8,83	Sim	Sim	Secretada (98%)	**DUF_61**
LepA628	76%	638	72,1	8,67	Sim	Não	Secretada (97%)	**DUF_61**
LepA400	73%	627	71,1	8,82	Sim	Não	Secretada (98%)	**DUF_61**
LepA402	60%	663	74,6	8,80	Não	Sim	Secretada (98%)	**DUF_61**

As doze proteínas encontradas possuem características muito semelhantes entre si, como número de aminoácidos, massa molecular (em kDa) e ponto isoelétrico (pI) preditos, presença de peptídeo sinal/região transmembrana, a localização subcelular e o compartilhamento de um domínio de função desconhecido (denominado DUF_61), indicando a formação de uma família de proteínas parálogas em *L. interrogans* (Tabela 9).

A análise do domínio DUF_61 mostrou que este domínio está presente apenas em espécies patogênicas de *Leptospira* e levou à identificação de uma 13ª proteína (LepA591) em *L. interrogans* (serovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130). O alinhamento múltiplo das 13 proteínas com o domínio DUF_61 através das ferramentas CLUSTALW e UGENE resultou no posicionamento da proteína LepA591 na porção carboxi-terminal (Figura 27), sendo aparentemente truncada em relação às outras doze proteínas por possuir apenas 313 aminoácidos. A proteína LepA591 não foi encontrada no alinhamento com a sequência presente no Fago 3.25, pois esta se encontra mais próxima à região amino-terminal. No

alinhamento múltiplo realizado, foi possível identificar 12 resíduos de cisteína conservados ao longo das proteínas (Figura 27).




LepA835
LepA388
LepA589
LepA934
LepA490
LepA271
LepA639
LepA769
LepA620
LepA628
LepA400
LepA402
LepA591

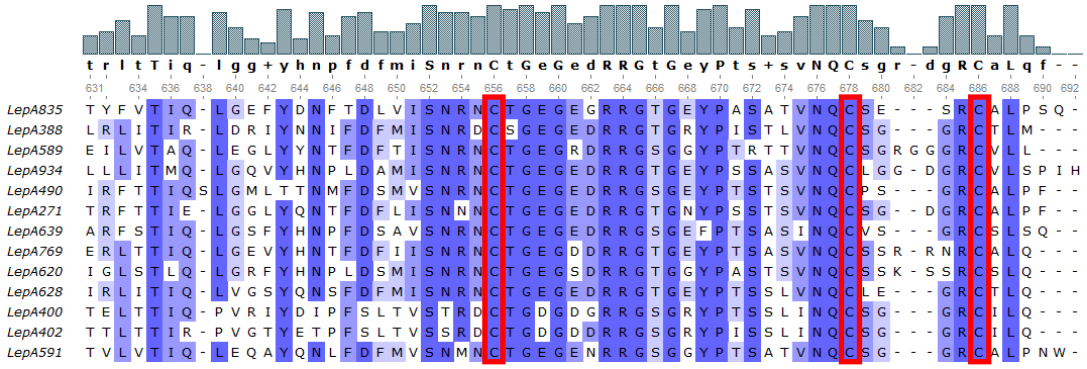


Figura 27. Alinhamento múltiplo entre as 13 proteínas parálogas da família DUF_61 presentes em *L. interrogans* (serovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130). O alinhamento das sequências foi realizado pela ferramenta online CLUSTALW e posteriormente analisado pelo software UGENE, onde foi aplicado o código de cores baseado na porcentagem de identidade entre as sequências. Em destaque, estão as posições do peptídeo sinal e/ou região transmembrana preditos (*azul escuro*), da sequência presente no Fago 3.25 (*amarelo*) e de 12 resíduos de cisteína conservados entre as 13 proteínas (*vermelho*). Na figura, a sequência consenso resultante também está representada.

A Figura 28 apresenta as sequências nucleotídica e peptídica da proteína LepA388, a qual possui um peptídeo sinal e/ou uma região transmembrana, como detalhado nas Tabelas 8 e 9. O domínio DUF_61 não está representado, pois sua extensão ocupa quase que totalmente a proteína (entre os aminoácidos 6 e 629), ocorrendo o mesmo com as outras 12 proteínas da família. A partir do alinhamento múltiplo das 13 proteínas, foi possível avaliar as regiões de maior semelhança entre elas, as quais foram utilizadas como base para o desenho de oligonucleotídeos para a clonagem de três porções da proteína LepA388 (LepA388F, LepA388P e LepA388NR), com o objetivo de serem amplificadas por PCR de alta fidelidade e posteriormente clonadas no vetor de expressão pAE (Figura 28).

Com a sequência peptídica da proteína LepA388, foi possível realizar a análise de regiões hidrofóbicas e hidrofílicas em sua estrutura, através do gráfico de hidropatia construído pelo método Kyte-Doolittle (Figura 29). No gráfico, o maior pico que ultrapassa a linha vermelha indica uma possível região transmembrana, corroborando a predição realizada anteriormente. Pode-se observar também que grande parte da proteína possui caráter hidrofílico e os picos mais negativos indicam possíveis regiões expostas na proteína.

```
ATG AGT CGT TGG ATA GTT TTA TTG TTA GTT TTG TTA ATC TCG CTT GGA GTT GGT TAC TCT TAC GGT   (66)
 M   S   R   W   I   V   L   L   L   V   L   L   I   S   L   G   V   G   Y   S   Y   G    22

                                  |          LepA388F          >          |  LepA388P  >
GTA AAT CCA GAT GTT GTT CCC ATT TCA TCG AAT GAT ATT CCT AGT TCA ATC ATT CAA AGA CCT ACT  (132)
 V   N   P   D   V   V   P   I   S   S   N   D   I   P   S   S   I   I   Q   R   P   T    44

|        >
GAT AAA CCA AAA GAT AAA CCT ATC AAA ATT GTG ATT CAT GAT GGA GGG ACT TTT TGT TAC GGT CCT  (198)
 D   K   P   K   D   K   P   I   K   I   V   I   H   D   G   G   T   F   C   Y   G   P    66

ACT TTT AGC GGT GGT GAA AGT TAC ATT GTG ATC GAA CAG TGT TGG CAA ATG AAC GTT ATG AAT GCA  (264)
 T   F   S   G   G   E   S   Y   I   V   I   E   Q   C   W   Q   M   N   V   M   N   A    88

AGA TAC GAC GTG TTT CAA AGA ATT TCG TAT AAC ATT AAT AAC ACG TGG TTA TGT ATC ACC GTC CCA  (330)
 R   Y   D   V   F   Q   R   I   S   Y   N   I   N   N   T   W   L   C   I   T   V   P   110

GAG AGT GTA GTT AAG GGA GAG ACA AAT TGG GAC TAT GTT CAC CTC AGA CCT TGT ACA ATC AAT GAT  (396)
 E   S   V   V   K   G   E   T   N   W   D   Y   V   H   L   R   P   C   T   I   N   D   132

CCT CTG CAA AGA TGG ATC GTA AAA GAC AAT TCC TTT TGG ACA GCA GAT AAG CGT TAT CGG TTA AAA  (462)
 P   L   Q   R   W   I   V   K   D   N   S   F   W   T   A   D   K   R   Y   R   L   K   154

GAT TAT AAT TGG TAT GCC TAT ATT TCA AAA AAC TCG GGG GAT AGA TAC AAT CAT ACC TTA GAT TCT  (528)
 D   Y   N   W   Y   A   Y   I   S   K   N   S   G   D   R   Y   N   H   T   L   D   S   176

TCA ATG AGT GAT TGG ATC AAT ACT GTA GCC ACT CCC GGT AAC ATC AGT ATT TTG ACT TCC ATC GCT  (594)
 S   M   S   D   W   I   N   T   V   A   T   P   G   N   I   S   I   L   T   S   I   A   198

TGG AAT TTA GGA AGC GAT CGT TAT TTT ATT CGT TCA GGA GGT TCA GAT AAA AAT ACG ACA CCT ATT  (660)
 W   N   L   G   S   D   R   Y   F   I   R   S   G   G   S   D   K   N   T   T   P   I   220

                                                                                  <  |
TAC TAC AAT CCC GAA AGT GGA CAT CTT GCT CAA TAC AAT CCA GTG AGT GGA TCG CTC TAT TGT ATG  (726)
 Y   Y   N   P   E   S   G   H   L   A   Q   Y   N   P   V   S   G   S   L   Y   C   M   242

<        LepA388P          TTA
TAT TCT CGG GTA GGT AGT TAT AAT TGG AAT TGG GTG ACG TGG GCA TTG TGT AGT GAT GCG CCT ATC  (792)
 Y   S   R   V   G   S   Y   N   W   N   W   V   T   W   A   L   C   S   D   A   P   I   264

                        LepA388NR          >
AGT AAG GAC AAT CCC GCT TTT TGG AAT GTC TCT TAT GAA ACG GAA GAA GGT GGA ATG ATC ATG GAT  (858)
 S   K   D   N   P   A   F   W   N   V   S   Y   E   T   E   E   G   G   M   I   M   D   286

TAT CAA GGC AAC GCA CTG AGA GTT GCC AGG TAT GGA CCT AAT TGG GGT GTT GCG TAT GCG GCT AAA  (924)
 Y   Q   G   N   A   L   R   V   A   R   Y   G   P   N   W   G   V   A   Y   A   A   K   308

CTT TCT TAT TTG AAA AAG GAT ACA ACC TAT AAC CCG ACT TCT CTA TTT ATC GTT GAT AGA AAT TTA  (990)
 L   S   Y   L   K   K   D   T   T   Y   N   P   T   S   L   F   I   V   D   R   N   L   330

TTA AAT TGG GTC CGT TAC ACA GCA AGT AAT CTT GGA AAG ACA GAT CAG TAT TGT CCA GCT GGT AAG (1056)
 L   N   W   V   R   Y   T   A   S   N   L   G   K   T   D   Q   Y   C   P   A   G   K   352

AAA GAA AAT CAT AAT ATA ACA ATA AAA AGG AAT TTA CCA CCG GGC TTT CAA TTA ACC GAG GAA TGG (1122)
 K   E   N   H   N   I   T   I   K   R   N   L   P   P   G   F   Q   L   T   E   E   W   374

ATT AGA AGA CTT TAT GAT ATA ACA AAT TCA ACT TTA TCT GCA GGT GAG GTA CAG ATA CAC GGT ATA (1188)
 I   R   R   L   Y   D   I   T   N   S   T   L   S   A   G   E   V   Q   I   H   G   I   396

TGC GGA GTT TGT TTA CTT CAT ACC TTC CAG ATG TTG GCA GAA CTT CAG GAG TAT CAT TCT CAC GGA (1254)
 C   G   V   C   L   L   H   T   F   Q   M   L   A   E   L   Q   E   Y   H   S   H   G   418

CCA ATT CAG GGT GGA GGT TAC TTC TTC GAC ACA GCT CCT AAT AGA GAT CCT TTT GAC TCG TTT AGA (1320)
 P   I   Q   G   G   G   Y   F   F   D   T   A   P   N   R   D   P   F   D   S   F   R   440

                                <          LepA388NR          TTA
CAA CGT TAT CCG GAA TTG GAC GCG TTG TTA GTA AAT GTA CCT AAC GTA TAT GGT TCT GCC GGT AGC (1386)
 Q   R   Y   P   E   L   D   A   L   L   V   N   V   P   N   V   Y   G   S   A   G   S   462

ACA ACT AGA CTA CTA ACA TTA GCA TCC GCT CGG ATT ATG TTA CCT CAA TAC AAC TGG ATC CTC TCT (1452)
 T   T   R   L   L   T   L   A   S   A   R   I   M   L   P   Q   Y   N   W   I   L   S   484

CGT GAA TTT ACC ACT CGA TCT GAA ATT TTA TCT CAT ATA AGA TCA CTT ATA GGT TCT CCC GCC GGA (1518)
 R   E   F   T   T   R   S   E   I   L   S   H   I   R   S   L   I   G   S   P   A   G   506

AGT GTT TGG TTG GCG TTA ATG TTG CGA TAT AGT CCA TAT GCA AGA ACT CTA ATA TGG CAT GCC GTT (1584)
 S   V   W   L   A   L   M   L   R   Y   S   P   Y   A   R   T   L   I   W   H   A   V   528

CCA ATT CTT AGA ACC TCT CAA GGG TTA GTA GTA ATT CCA ACG AAT TGG TCT GGG CTG CCA TTG AAT (1650)
 P   I   L   R   T   S   Q   G   L   V   V   I   P   T   N   W   S   G   L   P   L   N   550
```

```
GTC TAT AGG CTC TAT TTA ACT CCC ACC ACG GAT CCG TTC CAG GTA ATC AGT AAT CTA GAA ATA CCA (1716)
 V   Y   R   L   Y   L   T   P   T   T   D   P   F   Q   V   I   S   N   L   E   I   P    572

AGT AGA CCC CTA CTG AGA CTT ATC ACA ATA CGA TTA GAT CGG ATT TAC AAT AAT ATT TTT GAT TTC (1782)
 S   R   P   L   L   R   L   I   T   I   R   L   D   R   I   Y   N   N   I   F   D   F    594

ATG ATC TCT AAT AGG GAT TGT AGT GGA GAA GGA GAA GAT AGA AGA GGT ACA GGA CGA TAT CCA ATC (1848)
 M   I   S   N   R   D   C   S   G   E   G   E   D   R   R   G   T   G   R   Y   P   I    616

                                    <          LepA388F          |
AGT ACA TTA GTA AAT CAG TGC TCG GGA GGT AGA TGC ACA TTG ATG TAA (1896)
 S   T   L   V   N   Q   C   S   G   G   R   C   T   L   M       631
```

Figura 28. Sequências nucleotídica e peptídica da proteína LepA388. Na figura, estão destacadas as posições do peptídeo sinal e/ou região transmembrana da proteína (*azul*), da sequência apresentada pelo Fago 3.25 (*amarelo*) e dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação das sequências selecionadas para clonagem (LepA388F em *azul claro*, LepA388P em *rosa* e LepA388NR em *verde*). A posição do domínio de função desconhecida (DUF_61) não está representada, pois este ocupa praticamente toda a extensão da proteína.

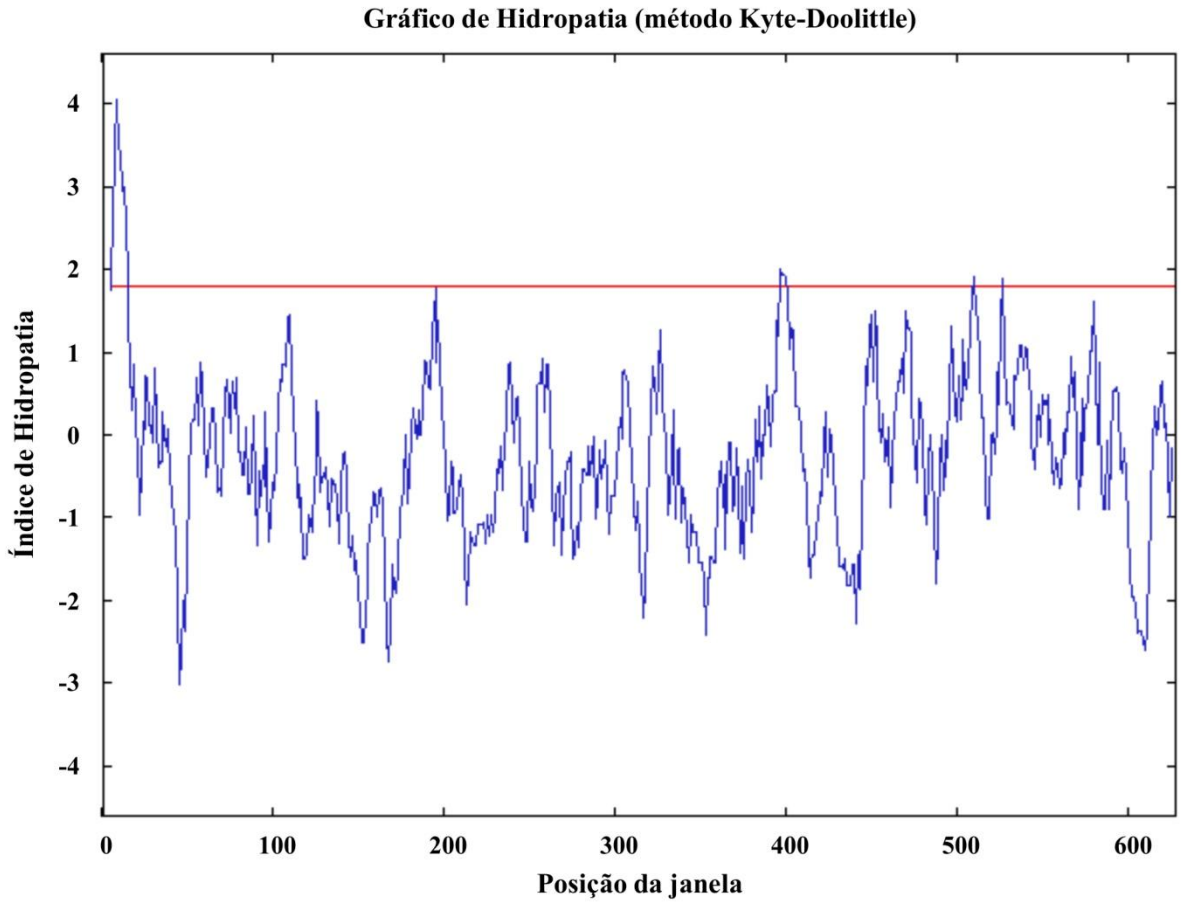


Figura 29. Análise de hidropatia da proteína LepA388. Gráfico obtido a partir da sequência peptídica da proteína e plotado conforme o método de Kyte-Doolittle. O tamanho da janela utilizado foi de 9. A linha vermelha corresponde ao índice 1,8: acima da linha estão as porções mais hidrofóbicas que indicam possíveis regiões transmembrana, enquanto que abaixo da linha estão as porções mais hidrofílicas, em que os picos mais negativos são possíveis regiões expostas em proteínas globulares. Resultado obtido e adaptado do sítio http://gcat.davidson.edu/rakarnik/kyte-doolittle.htm.

A sequência consenso obtida no alinhamento múltiplo foi submetida a um novo alinhamento (BLASTp) com as proteínas da própria família DUF_61, sendo possível determinar as proteínas com maior (LepA271) e menor (LepA402) identidade à sequência consenso (Tabela 10). A partir deste resultado, também foram desenhados oligonucleotídeos para a clonagem das proteínas LepA271 e LepA402 da mesma forma que para LepA388, mas apenas a porção com a proteína completa sem o peptídeo sinal/região transmembrana foi amplificada e clonada no vetor de expressão pAE (LepA271F e LepA402F, respectivamente).

Tabela 10

Identidade das 13 proteínas da família DUF_61 em *L. interrogans* após alinhamento com a sequência consenso (a partir do alinhamento múltiplo) por BLASTp, em ordem decrescente. Em destaque, estão as proteínas com maior (*verde*) e menor (*vermelho*) identidade ao consenso, eliminando a proteína LepA591.

Nome das proteínas	***Max score***	**BLASTp *Ident***
LepA271	**1034**	**82%**
LepA934	1031	81%
LepA490	998	78%
LepA620	988	77%
LepA769	971	79%
LepA639	953	76%
LepA589	949	77%
LepA388	946	78%
LepA835	945	79%
LepA628	934	73%
LepA400	845	70%
LepA402	**820**	**67%**
LepA591	389	72%

Adicionalmente, a fim de analisar a presença do domínio DUF_61 em outras bactérias, foi realizado um novo alinhamento (BLASTp) da sequência presente no Fago 3.25, eliminando-se o gênero *Leptospira* da pesquisa. As proteínas com maior identidade à

sequência do fago pertencem à espécie *Bartonella australis*, apresentando características muito semelhantes às proteínas encontradas em *Leptospira* (Tabela 11).

Tabela 11

Características das primeiras 10 proteínas alinhadas à sequência do Fago 3.25 por BLASTp, em ordem decrescente, eliminando as espécies de *Leptospira*. Todas as proteínas pertencem à espécie *Bartonella australis*. As predições de peptídeo sinal, região transmembrana, localização subcelular e domínios existentes foram realizadas pelos programas *Phobius*, *TMHMM*, *LocTree3* e *SSDB Motif Search*, respectivamente. O domínio de função desconhecida (DUF_61) comum entre as proteínas está destacado.

Nome das proteínas	BLASTp *Ident*	nºAA	Peptídeo sinal	Região transmembrana	Localização subcelular (%)	Domínio(s)
BAnh1_02700	54%	659	Sim	Sim	Secretada (97%)	**DUF_61**
BAnh1_04140	53%	661	Sim	Sim	Secretada (95%)	**DUF_61**
BAnh1_02730	54%	662	Sim	Não	Secretada (98%)	**DUF_61**
BAnh1_04150	52%	651	Sim	Sim	Secretada (98%)	**DUF_61**
BAnh1_04180	52%	632	Sim	Não	Secretada (98%)	**DUF_61**
BAnh1_02780	51%	660	Sim	Sim	Secretada (97%)	**DUF_61**
BAnh1_04110	52%	651	Não	Sim	Secretada (98%)	**DUF_61**
BAnh1_04120	51%	660	Sim	Sim	Secretada (98%)	**DUF_61**
BAnh1_02770	51%	653	Sim	Sim	Secretada (98%)	**DUF_61**
BAnh1_04130	50%	658	Sim	Sim	Secretada (97%)	**DUF_61**

4.6. Expressão das proteínas recombinantes LepA388P, LepA388NR e LepA388F

Devido às características interessantes apresentadas pela proteína LepA388 e pela família DUF_61, sua expressão foi priorizada sobre as outras proteínas encontradas. As proteínas recombinantes LepA388P, LepA388NR e LepA388F são as três porções originadas da proteína LepA388, e algumas de suas características foram preditas pelo programa Compute pI/Mw, incluindo as massas moleculares de aproximadamente 25 kDa, 25 kDa e 70 kDa, respectivamente, e pontos isoelétricos de 7,7, 6,2 e 8,4, respectivamente. Todas as proteínas são ricas em cisteínas e possuem uma sequência de seis histidinas na extremidade

amino-terminal, permitindo sua purificação por cromatografia em coluna de afinidade a níquel.

Inicialmente, a expressão das proteínas recombinantes foi testada em bactérias *E. coli* BL21 SI e BL21 Star (DE3)-pLysS. Clones de cada cepa bacteriana transformadas com as clonagens em pAE foram cultivados para a análise da expressão resultante de cada proteína. Foi possível observar a expressão das três proteínas recombinantes, a partir da comparação das culturas não induzidas e induzidas: as proteínas LepA388P e LepA388F mostraram um bom nível de expressão, enquanto que a proteína LepA388NR obteve baixa expressão (Figura 30). Como as bactérias BL21 Star (DE3)-pLysS apresentam uma banda intensa em torno de 25 kDa, não foi possível analisar a expressão das proteínas LepA388P e LepA388NR nesta cepa e, portanto, as bactérias BL21 SI foram escolhidas para a sua expressão (Figura A3 da seção Apêndices). Apesar de apresentar massa molecular menor do que o esperado (~65 kDa), a banda correspondente à proteína LepA388F foi a única que aumentou de intensidade nos três clones testados e a mesma observação não ocorreu nos testes de expressão das outras proteínas (LepA388P e LepA388NR) em bactérias BL21 Star (DE3)-pLysS (Figura 30 e Figura A3 da seção Apêndices), indicando que a banda representa a proteína LepA388F.

Em seguida, a solubilidade das proteínas recombinantes expressas foi testada a partir de novas culturas dos clones escolhidos para cada proteína. O precipitado celular obtido das culturas induzidas foi lisado e, após centrifugação, as amostras resultantes do sobrenadante e do precipitado foram analisadas. A Figura 31 mostra que as três proteínas recombinantes são insolúveis, pois estão presentes apenas nas amostras precipitadas e ressuspensas em tampão com 8 M de ureia e 5 mM de β-mercaptoetanol. Provavelmente, as proteínas expressas estão em corpúsculos de inclusão. Foi possível observar também que a proteína LepA388P possui nível intenso de expressão em relação às outras proteínas.

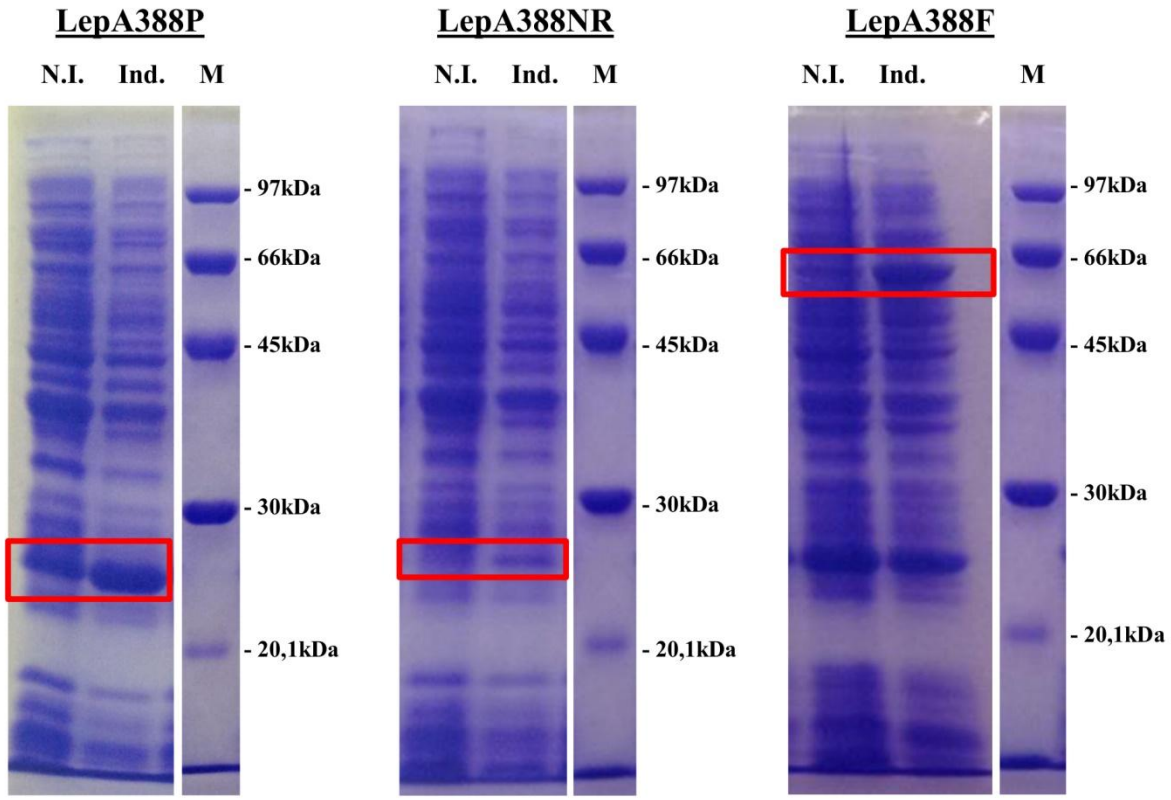


Figura 30. Análise da expressão das proteínas LepA388P, LepA388NR e LepA388F em bactérias *E. coli*. SDS-PAGE comparando culturas não induzidas (*N.I.*) e induzidas (*Ind.*). As proteínas LepA388P e LepA388NR foram expressas em BL21 SI e induzidas com 300 mM de NaCl, enquanto que a proteína LepA388F foi expressa em BL21 Star (DE3)-pLysS e induzida com 1,2 mM IPTG. As bandas correspondentes às proteínas recombinantes estão destacadas na figura: ~25 kDa para as proteínas LepA388P e LepA388NR, e ~65 kDa para a proteína LepA388F. Os géis contêm 12% de poliacrilamida e foram corados com azul de Coomassie. **M -** Marcador *Amersham Low Molecular Weight* (GE Healthcare Life Sciences®).

Na tentativa de obter as proteínas recombinantes expressas de forma solúvel, a expressão da proteína LepA388P foi induzida em bactérias *E. coli* Origami, as quais foram testadas em diferentes condições de cultivo (presença/ausência de 1% de glicose no meio de cultura) e em diferentes condições para expressão (temperatura de 37°C ou 30°C e quantidade de indutor entre 0,1 mM, 0,5 mM e 1mM de IPTG). Entretanto, em todas as condições testadas, a proteína LepA388P continuou a ser expressa de forma insolúvel (Figura A4 da seção Apêndices).

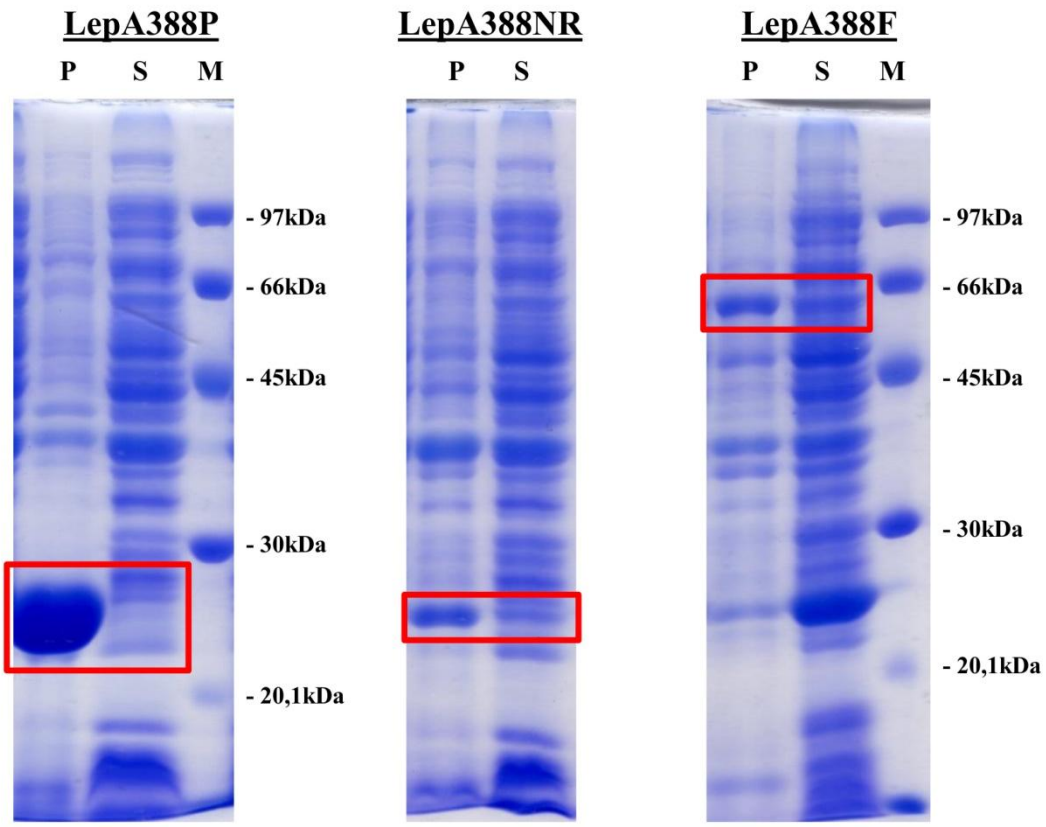


Figura 31. Análise da solubilidade das proteínas LepA388P, LepA388NR e LepA388F expressas em bactérias *E. coli* BL21 SI ou BL21 Star (DE3)-pLysS. SDS-PAGE das proteínas insolúveis (*P* = precipitado celular) e das proteínas solúveis (*S* = sobrenadante) obtidas a partir da lise e centrifugação de culturas induzidas expressando cada proteína. As bandas correspondentes às proteínas recombinantes estão destacadas na figura (LepA388P e LepA388NR = ~25 kDa; LepA388F = ~65 kDa). Os géis contêm 12% de poliacrilamida e foram corados com azul de Coomassie. **M-** Marcador *Amersham Low Molecular Weight* (GE Healthcare Life Sciences®).

4.7. Renaturação das proteínas recombinantes LepA388P, LepA388NR e LepA388F

A partir dos resultados obtidos com os testes de expressão, as proteínas recombinantes de LepA388 passaram a ter sua expressão induzida em culturas de média escala (0,5-2 L) para posterior purificação. A expressão foi realizada em bactérias BL21 SI ou BL21 Star (DE3)-pLysS e, após lise e centrifugação das culturas resultantes, as amostras precipitadas com as proteínas recombinantes foram solubilizadas, utilizando concentrações crescentes de ureia (2 M, 4 M e 8 M). As proteínas se mostraram solúveis apenas em tampão com 8 M de ureia e 5 mM de β-mercaptoetanol (Figura A5 da seção Apêndices).

Como a ureia é um agente caotrópico, as proteínas recombinantes em solução com altas concentrações de ureia estão desnaturadas. Por esta razão, algumas técnicas para renaturação das proteínas foram testadas.

4.7.1. Renaturação por diálise gradual

A primeira tentativa para renaturar as proteínas recombinantes em solução com 8 M de ureia foi a realização de diálises sequenciais para a remoção gradual de ureia da solução. Primeiramente, as soluções com as proteínas em 8 M de ureia foram centrifugadas, a fim de retirar possíveis precipitados das soluções, as quais foram posteriormente diluídas (ver itens 3.15 e 3.16.1 da seção Material e Métodos). As diálises sequenciais foram feitas em tampão com 6 M, 4 M, 2 M e 0 M de ureia.

Ao final das diálises, as soluções com as proteínas estavam aparentemente transparentes, mas era possível observar também alguns pequenos precipitados. Para confirmar se as proteínas estavam solúveis ou haviam precipitado após a remoção da ureia, as soluções foram centrifugadas e amostras resultantes do sobrenadante ou do precipitado celular foram analisadas. A Figura 32 mostra que, apesar da baixa concentração das proteínas utilizadas, somente as amostras precipitadas após as diálises (*0M P*) continham as proteínas e, portanto, as proteínas precipitaram durante a retirada da ureia, principalmente nas últimas diálises com as menores concentrações do agente caotrópico.

4.7.2. Renaturação por altas pressões hidrostáticas

Outra técnica testada para a renaturação das proteínas recombinantes foi a utilização de altas pressões hidrostáticas, a qual desfavorece interações intermoleculares e promove a dissociação de agregados proteicos. Após nova expressão das proteínas recombinantes, os corpúsculos de inclusão resultantes foram preparados para a renaturação das proteínas, sendo

diluídos em 50 mM de tampão Tris-EDTA pH 8,0, na presença ou ausência de agentes caotrópicos (1 M de hidrocloreto de guanidina), aminoácidos (500 mM de L-arginina pH 11,0) e um sistema redox (5 mM de glutationa reduzida e oxidada 1:1) (ver item 3.16.2 da seção Material e Métodos). Depois de serem submetidas a altas pressões de 2,5 kbar, as amostras resultantes foram dialisadas para a remoção dos reagentes utilizados, e centrifugadas para a análise das proteínas solúveis e precipitadas durante o processo.

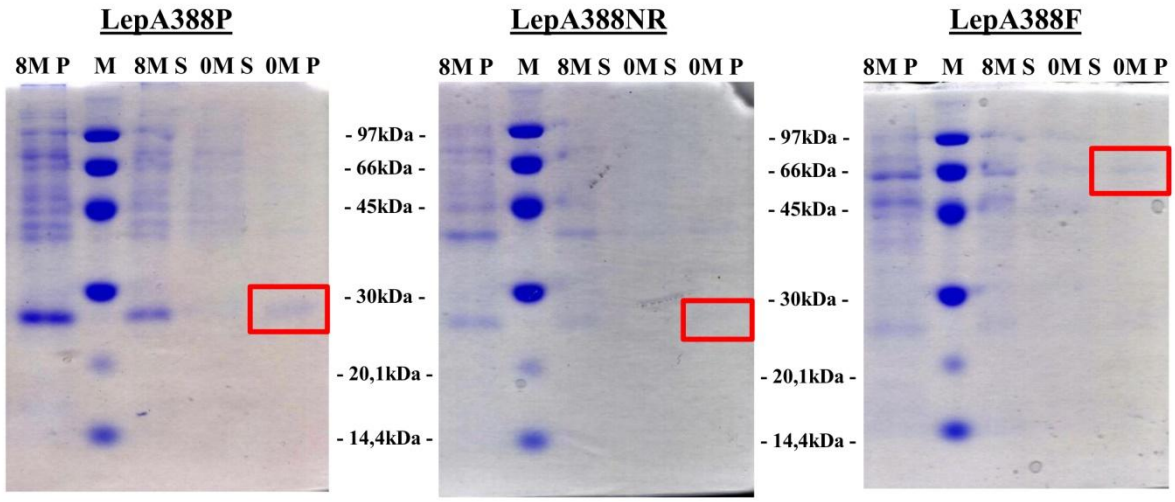


Figura 32. Renaturação por diálise gradual das proteínas LepA388P, LepA388NR e LepA388F. SDS-PAGE de amostras solubilizadas em 8 M de ureia (*8M S*), as quais foram utilizadas para a diálise gradual em tampão com 6M, 4M, 2M e 0M de ureia. As amostras resultantes foram analisadas após centrifugação (*0M S* = sobrenadante e *0M P* = precipitado celular). As amostras iniciais obtidas após lise celular e centrifugação das culturas expressando as proteínas e ressuspensas em 8 M de ureia estão representadas (*8M P*). As bandas correspondentes às proteínas recombinantes estão destacadas na figura (LepA388P e LepA388NR = ~25 kDa; LepA388F = ~65 kDa). Os géis contêm 12% de poliacrilamida e foram corados com azul de Coomassie. **M-** Marcador *Amersham Low Molecular Weight* (GE Healthcare Life Sciences®).

A Figura 33 apresenta as amostras solúveis resultantes dos seis tratamentos testados, em que as três proteínas recombinantes se mostraram solúveis principalmente após o tratamento 3 (50 mM Tris-EDTA pH 8,0 + 500 mM L-arginina pH 11,0). As proteínas LepA388P e LepA388NR também estavam solúveis após o tratamento 4 (50 mM Tris-EDTA + 500 mM L-arginina pH 11,0 + 5 mM GSH/GSSG), entretanto, a análise das amostras

precipitadas confirma que o tratamento 3 foi o mais eficiente para a solubilização das proteínas, pois não resultou em precipitação das proteínas recombinantes (Figura A6 da seção Apêndices).

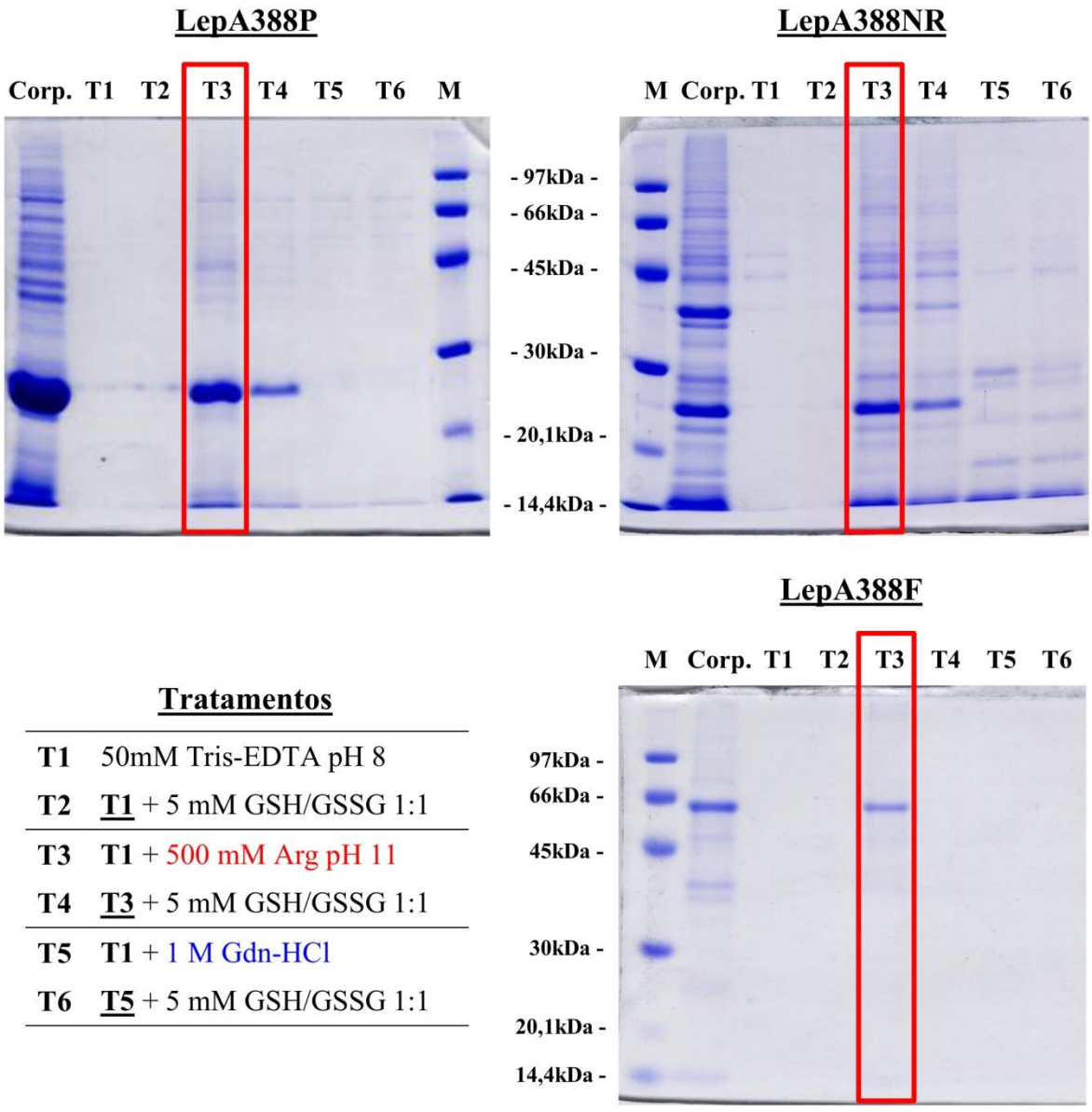


Figura 33. Renaturação por altas pressões hidrostáticas das proteínas LepA388P, LepA388NR e LepA388F. SDS-PAGE de amostras de corpúsculos de inclusão lavados (*Corp.*) para cada proteína, os quais foram submetidos à renaturação com um dos seis tratamentos (*T1-T6*), resumidos na tabela apresentada. Após renaturação e diálise, as amostras foram centrifugadas e apenas os sobrenadantes contendo proteínas solúveis foram aplicados nos géis. Em destaque, está o tratamento mais eficiente para a solubilização de cada proteína. LepA388P e LepA388NR = ~25 kDa; LepA388F = ~65 kDa. Os géis contêm 12% de poliacrilamida e foram corados com azul de Coomassie. **M-** Marcador *Amersham Low Molecular Weight* (GE Healthcare Life Sciences®).

Os resultados obtidos após a tentativa de renaturação das proteínas por altas pressões hidrostáticas apresentaram a possibilidade das proteínas estarem apenas solubilizadas após o tratamento 3, pois a solução de L-arginina utilizada com pH 11,0 pode ter desnaturado as proteínas por propiciar um ambiente muito alcalino durante o processo. A diálise realizada depois do tratamento reduziu o pH para aproximadamente 9,0, ainda deixando as soluções muito alcalinas.

Algumas tentativas de reduzir ainda mais o pH das soluções resultantes, assim como outros testes de renaturação por altas pressões hidrostáticas utilizando reagentes com pH neutro (50 mM Tris-EDTA pH 7,0 e L-arginina pH 7,0), resultaram em precipitação das proteínas. A renaturação das proteínas também foi testada em colunas de afinidade a níquel, através do protocolo baseado no modelo de "On-column refolding" do sistema cromatográfico ÄKTA, em que a renaturação e a purificação de proteínas são acopladas. Entretanto, as proteínas também precipitaram durante este processo (dados não apresentados).

4.8. Purificação da proteína recombinante LepA388P

Mesmo após algumas tentativas, a renaturação das proteínas recombinantes LepA388P, LepA388NR e LepA388F não foi bem sucedida. Adicionalmente, nas diversas culturas realizadas para a expressão das proteínas, o rendimento resultante de LepA388NR e LepA388F era insuficiente. Portanto, apenas a proteína LepA388P foi priorizada para purificação e posterior obtenção de anticorpos em camundongos. A amostra inicial utilizada continha a proteína solúvel em tampão 8 M de ureia e 5 mM de β-mercaptoetanol, a qual foi aplicada a uma coluna de afinidade a níquel (Ni^{2+}) para a adsorção da proteína pela sua sequência de histidinas na extremidade amino-terminal. O processo completo foi realizado com tampão contendo 8 M de ureia e 5 mM de β-mercaptoetanol.

A purificação foi feita com eluição em gradiente, a fim de determinar em que concentração de imidazol a proteína LepA388P é eluída. Segundo o gráfico resultante do cromatógrafo ÄKTAprime plus (GE Healthcare Life Sciences®), o início da eluição da proteína foi em torno de 250 mM de imidazol (~50% de B, Figura A7 da seção Apêndices), formando um pico de absorbância logo em seguida, o qual representa a eluição completa da proteína LepA388P. A alta e contínua absorbância após o pico de eluição representa a absorbância do imidazol que está em sua concentração máxima (500mM, 100% de B; Figura A7 da seção Apêndices).

A partir do gráfico resultante da purificação, amostras coletadas ao longo do processo foram analisadas para a confirmação da presença de proteína purificada. A Figura 34 mostra que a banda correspondente à proteína LepA388P aparece na amostra utilizada para a purificação (*Input*) e nas amostras de eluição (*19*, *20*, *21* e *22*) correspondentes ao pico de eluição no gráfico (Figura A7 da seção Apêndices), indicando que a purificação foi bem sucedida.

4.8.1. Quantificação da proteína recombinante LepA388P purificada

Devido à presença de ureia em alta concentração nas soluções com a proteína LepA388P purificada, sua quantificação foi estimada a partir de comparação com uma curva de BSA em SDS-PAGE. As amostras que apresentaram a proteína após a eluição (Figura 34) foram reunidas e preparadas para a análise e quantificação. A Figura 35 mostra as bandas resultantes da amostra com a proteína purificada e da curva com concentração decrescente de BSA. A partir dessa figura, a concentração da proteína LepA388P foi estimada através do programa ImageJ (NIH), resultando em aproximadamente 140 µg/ml. A amostra com a proteína purificada e de concentração definida foi utilizada para a imunização de camundongos e análise do antissoro resultante.

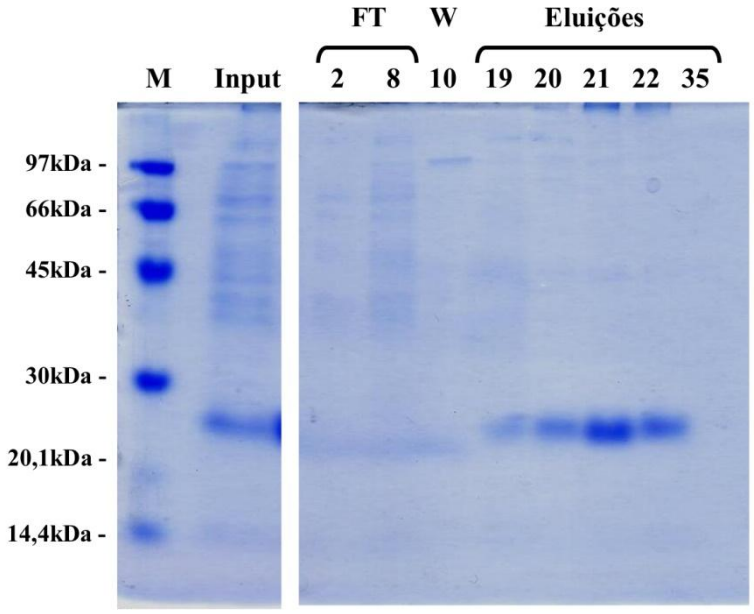


Figura 34. Análise da purificação da proteína LepA388P em coluna de afinidade a Ni^{2+}, através do ÄKTAprime plus (GE Healthcare Life Sciences®). SDS-PAGE de amostras não adsorvidas na coluna (*FT 2* e *8 = flow-through*), da lavagem (*W 10 = wash*) e das eluições com concentrações crescentes de imidazol (*19*, *20*, *21*, *22* e *35*). A amostra utilizada para a purificação estava solubilizada em 8 M ureia (*Input*), sendo também eluída em 8 M de ureia. A numeração das amostras (*2*, *8*, *10*, *19*, *20*, *21*, *22* e *35*) representa a ordem em que as amostras foram coletadas durante o processo de purificação (ver gráfico da Figura A7 da seção Apêndices). A banda correspondente à proteína LepA388P recombinante possui ~25 kDa. O gel contém 12% de poliacrilamida e foi corado com azul de Coomassie. **M-** Marcador *Amersham Low Molecular Weight* (GE Healthcare Life Sciences®).

4.9. ELISA para titulação do antissoro da proteína recombinante LepA388P

A titulação dos antissoros pré-imune e imunes obtidos da imunização de camundongos com a proteína recombinante LepA388P foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA). Inicialmente, os antissoros pré-imune e o primeiro imune (obtido após a terceira dose; ver item 3.18 da seção Material e Métodos) foram testados com 100 ng da proteína LepA388P purificada, seguindo as diluições 1:20 até 1:20.480. O antissoro pré-imune não reagiu com a proteína LepA388P como esperado, mas também não foi possível determinar o título do antissoro imune, pois a reação com a maior diluição (1:20.480) apresentou intensa absorbância (dados não apresentados).

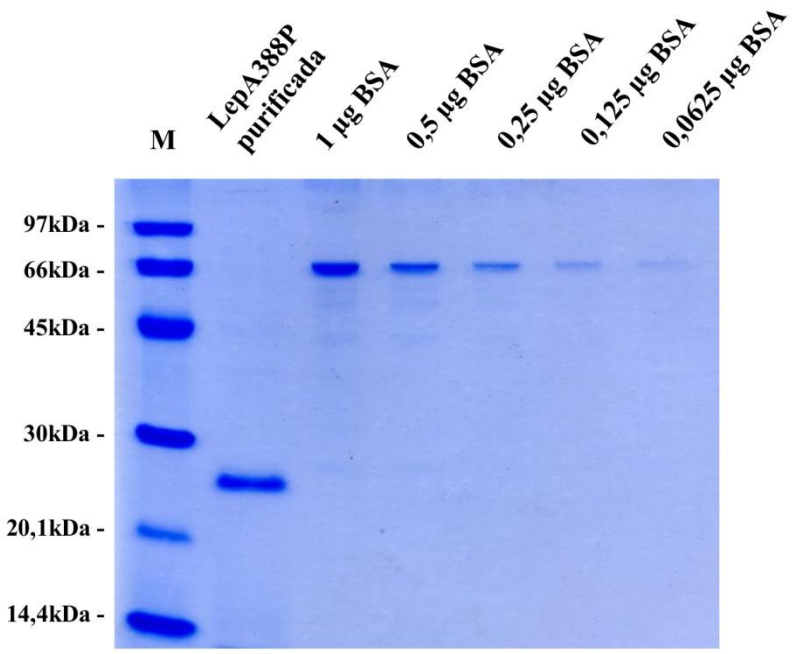


Figura 35. Análise da proteína LepA388P purificada e comparação com curva de BSA. SDS-PAGE da combinação de todas as amostras com a proteína *LepA388P purificada*, seguida por amostras com quantidades decrescentes de BSA (*1 µg*, *0,5 µg*, *0,25 µg*, *0,125 µg* e *0,0625 µg*). Posteriormente, a concentração da proteína foi estimada a partir da curva de BSA com o auxílio do programa ImageJ. A banda correspondente à proteína LepA388P recombinante possui ~25 kDa. O gel contém 12% de poliacrilamida e foi corado com azul de Coomassie. **M-** Marcador *Amersham Low Molecular Weight* (GE Healthcare Life Sciences®).

A fim de determinar o título do primeiro antissoro imune, outro ensaio foi realizado com 100 ng de proteína purificada e os antissoros diluídos em 1:1.000 até 1:1.024.000. A Figura 36 mostra a absorbância a 492 nm resultante das diluições dos antissoros pré-imune e imune, após subtração da absorbância obtida pelo controle negativo (sem adição de antissoros). O título do antissoro foi determinado pela diluição que apresentou absorbância resultante em torno de 0,1 e, portanto, o título foi definido como sendo aproximadamente 1:64.000.

O mesmo procedimento foi realizado com o segundo antissoro imune (obtido após a quarta dose; ver item 3.18 da seção Material e Métodos), o qual resultou em título de 1:128.000 (Figura A8 da seção Apêndices), mostrando que, mesmo após duas semanas após a

última dose da proteína LepA388P, os soros obtidos continuam apresentando alto título e confirmam a imunogenicidade elevada da proteína recombinante.

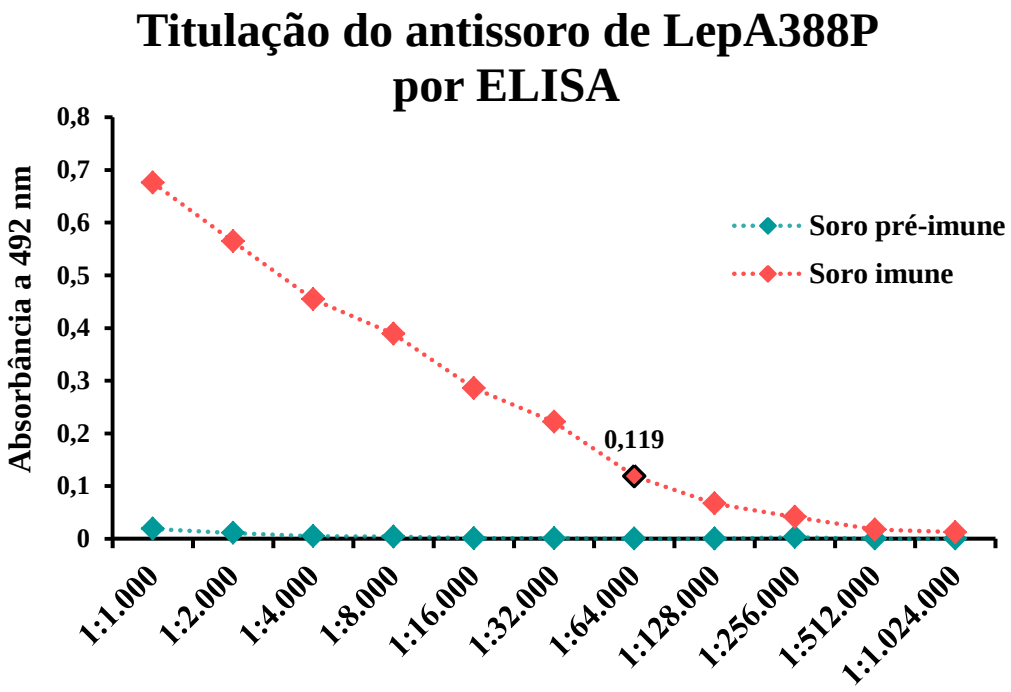


Figura 36. Titulação por ELISA de antissoros obtidos após imunização de camundongos com a proteína LepA388P recombinante. As sangrias para a obtenção dos antissoros foram realizadas antes da 1ª dose (*Soro pré-imune*) e depois da 3ª dose (*Soro imune*). Os valores plotados correspondem à absorbância a 492 nm resultante para cada diluição, subtraindo a absorbância obtida pelo controle negativo (sem adição de antissoros). O ponto destacado na curva apresentada pelas diluições do antissoro imune representa o título determinado para o antissoro, pois sua absorbância resultante é a mais próxima de 0,1.

4.10. *Western blotting* para análise do antissoro da proteína recombinante LepA388P

4.10.1 Teste de especificidade do antissoro

A especificidade do antissoro contra a proteína LepA388P foi analisada e comparada com diferentes proteínas recombinantes de *Leptospira* já purificadas em nosso laboratório, incluindo LipL32, rLIC10009 e HlyX, as quais possuem massa molecular de 32 kDa, 30 kDa e 42,3 kDa, respectivamente. Após revelação da membrana, a proteína LepA388P recombinante foi rapidamente detectada, mesmo com a diluição de 1:10.000 utilizada para o

antissoro. Adicionalmente, as outras proteínas de *Leptospira* não foram detectadas, indicando uma alta especificidade do antissoro à proteína LepA388P (Figura 37).

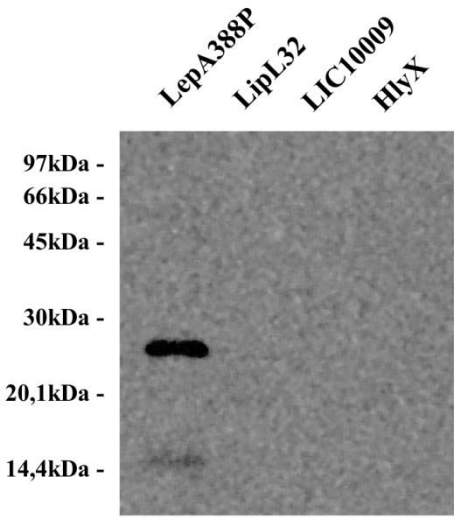


Figura 37. Análise da especificidade do antissoro contra a proteína recombinante LepA388P por *Western Blotting*. Amostras com 130 ng da proteína LepA388P e de outras proteínas recombinantes de leptospiras (LipL32, LIC10009 e HlyX) foram aplicadas em SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi submetida à incubação com o antissoro contra a proteína LepA388P diluído em 1:10.000. Após nova incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, as bandas foram reveladas com ECL Prime WB Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences®). A banda correspondente à proteína LepA388P recombinante possui ~25 kDa.

4.10.2 Painel de sorovares de *Leptospira*

Confirmada a especificidade do antissoro obtido pela proteína LepA388P, o mesmo antissoro foi utilizado para detectar a presença de proteínas nativas em diferentes sorovares de *Leptospira*. Como a sequência contida na proteína recombinante LepA388P é bastante conservada entre 12 proteínas da família paráloga DUF_61 em *L. interrogans* sorovar Copenhageni, era esperado que o antissoro reconhecesse não só essas proteínas, como também as proteínas pertencentes à família e com sequências similares presentes em outros sorovares. Entretanto, não foi possível detectar a presença das proteínas nativas nos diferentes

sorovares, nem mesmo no sorovar Copenhageni (cepa Fiocruz L1-130), utilizado para a clonagem e expressão da proteína LepA388P recombinante (Figura 38A).

Uma possível explicação seria a baixa qualidade dos extratos empregados nesta análise e, por esta razão, foi realizada a remoção dos anticorpos primários e secundários da membrana analisada (“*stripping”*), seguida pelo tratamento com um antissoro contra a proteína LipL32 (“*reprobing”*), a qual é uma lipoproteína abundante e presente apenas em espécies patogênicas de *Leptospira*. Após o tratamento da membrana, a presença da proteína LipL32 foi detectada em todos os sorovares patogênicos aplicados, indicando o bom estado dos extratos utilizados (Figura 38B).

Em conjunto, os resultados apresentados mostram que não foi possível observar a presença das proteínas da família DUF_61 nas condições que utilizamos. A expressão de tais proteínas pode ser induzida apenas durante a infecção de leptospiras nos hospedeiros, ambiente que promove sinais específicos, como temperatura e osmolaridade, os quais estão ausentes nas condições normais de cultura de leptospiras em meio EMJH a 30°C.

4.11. *Western blotting* para análise da expressão da proteína LepA388 e outras proteínas da família DUF_61 em diferentes culturas de *L. interrogans*

A fim de avaliar as condições que induzem a expressão da proteína LepA388 e dos outros membros da família paráloga DUF_61 em leptospiras, bactérias *L. interrogans* sorovar Copenhageni (cepa Fiocruz L1-130) foram expostas a diferentes condições durante 24 horas, com o objetivo de mimetizar alguns importantes sinais do ambiente de infecção de hospedeiros, como temperatura e osmolaridade, e analisar o efeito na expressão das proteínas da família DUF_61. Para tanto, as bactérias foram cultivadas em meio EMJH ou EMJH com adição de 120 mM de NaCl e incubadas a 30°C ou 37°C, e os precipitados celulares e

sobrenadantes das culturas resultantes foram tratados para análise por *Western Blotting* (ver Tabela 6 e item 3.20 da seção Material e Métodos).

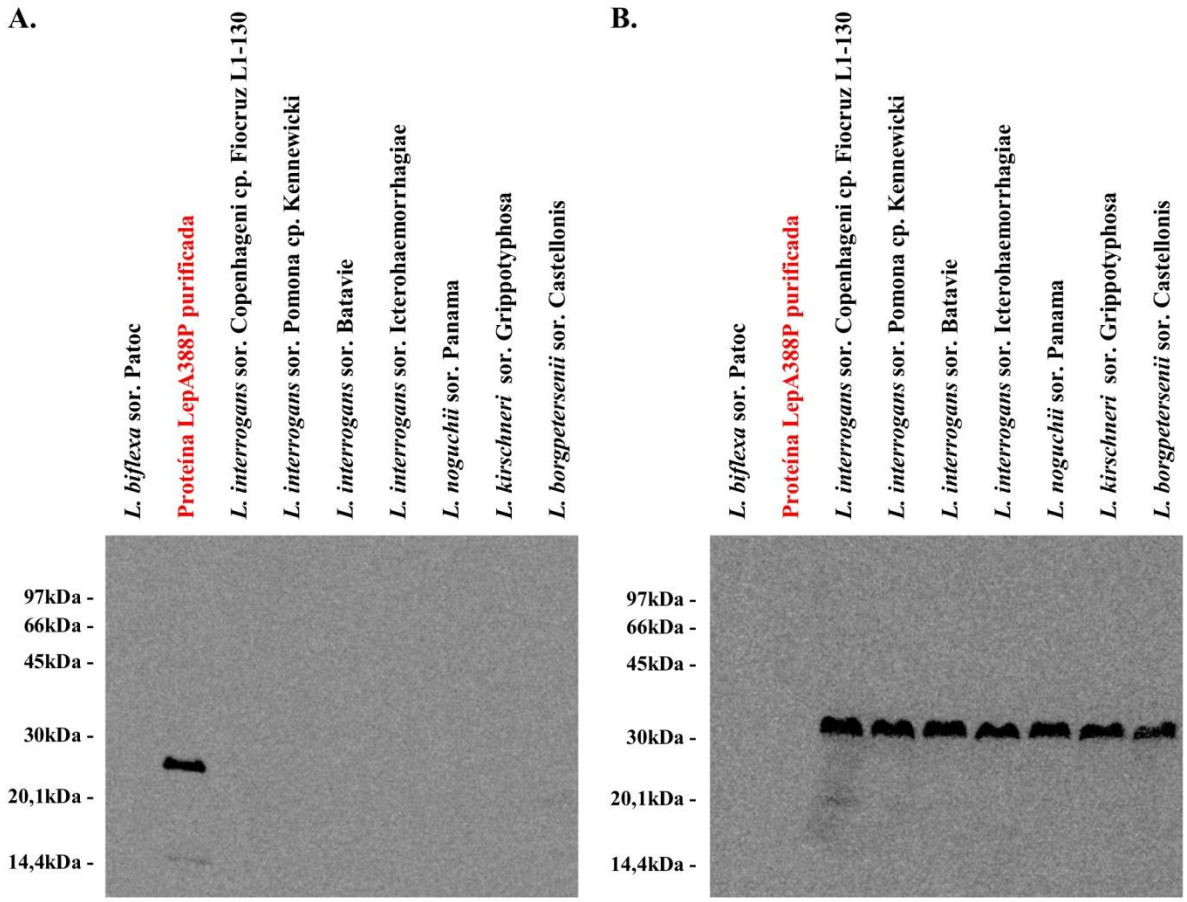


Figura 38. Detecção de proteínas nativas em diferentes sorovares de *Leptospira*, utilizando os antissoros contra as proteínas recombinantes LepA388P e LipL32, por *Western Blotting*. **A.** Amostras com 10 ng da proteína recombinante LepA388P e com 300 µg dos extratos de um sorovar saprofítico (*L. biflexa* sor. Patoc) e de sorovares patogênicos *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. kirschneri* e *L. borgpetersenii* foram aplicadas em SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi primeiramente submetida à incubação com o antissoro contra a proteína LepA388P diluído em 1:10.000. Após nova incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, as bandas foram reveladas com ECL Prime WB Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences®). **B.** Posteriormente, a mesma membrana foi submetida a "*stripping and reprobing*" com um antissoro contra a proteína LipL32, também diluído em 1:10.000, seguindo o mesmo protocolo realizado em (A). As bandas correspondentes às proteínas LepA388P e LipL32 recombinantes possuem ~25 kDa e 32 kDa, respectivamente.

A Figura 39 reúne a detecção dos membros da família DUF_61, além das proteínas LigA, LigB e LipL32 como controles, em amostras de extratos (precipitados celulares

tratados) e sobrenadantes imunoprecipitados com soro anti-LepA388P. Na Figura 39A, é possível observar a presença de bandas apenas nas amostras com sobrenadantes tratados, incluindo as bandas referentes às cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas envolvidas na imunoprecipitação. Uma banda acima de 76 kDa também está presente em todos os sobrenadantes, a qual poderia representar a proteína LepA388 e outras proteínas da família paráloga DUF_61, apesar de apresentar massa molecular acima da esperada para estas proteínas que possuem massas moleculares preditas entre 71,1 a 74,6 kDa.

A análise da Figura 39B indica que a indução da expressão *in vitro* de proteínas em leptospiras expostas a uma osmolaridade semelhante à encontrada nos hospedeiros foi efetiva, visto que a diferença de expressão das proteínas LigA e LigB é evidente entre as amostras de extrato cultivadas a 30°C em EMJH com ou sem adição de NaCl, assim como relatado por Matsunaga e colaboradores (MATSUNAGA *et al.*, 2005). Segundo a análise de expressão da proteína LipL32 (Figura 39C), a qual possui expressão constitutiva e invariável em leptospiras submetidas a diferentes condições de cultivo, as bactérias cultivadas a 37°C estão menos concentradas do que as bactérias cultivadas a 30°C. Entretanto, esta diferença não explica a ausência da detecção das proteínas Lig, cuja indução da expressão também era esperada nas culturas a 37°C (Figura 39B).

Por outro lado, as mesmas bandas acima de 76 kDa estão visíveis a partir do *Western blotting* com anti-LigB amino-terminal, indicando que estas bandas não correspondem às proteínas da família DUF_61 e, portanto, não conseguimos detectar sua expressão *in vitro*. A partir dos resultados obtidos, análises complementares são necessárias para melhor compreender as condições ideais para a expressão destas proteínas, como a avaliação de sua expressão *in vivo* em hospedeiros infectados com leptospiras. Dessa forma, seria possível elucidar com mais clareza o provável papel dos membros da família paráloga DUF_61 na infecção por leptospiras.

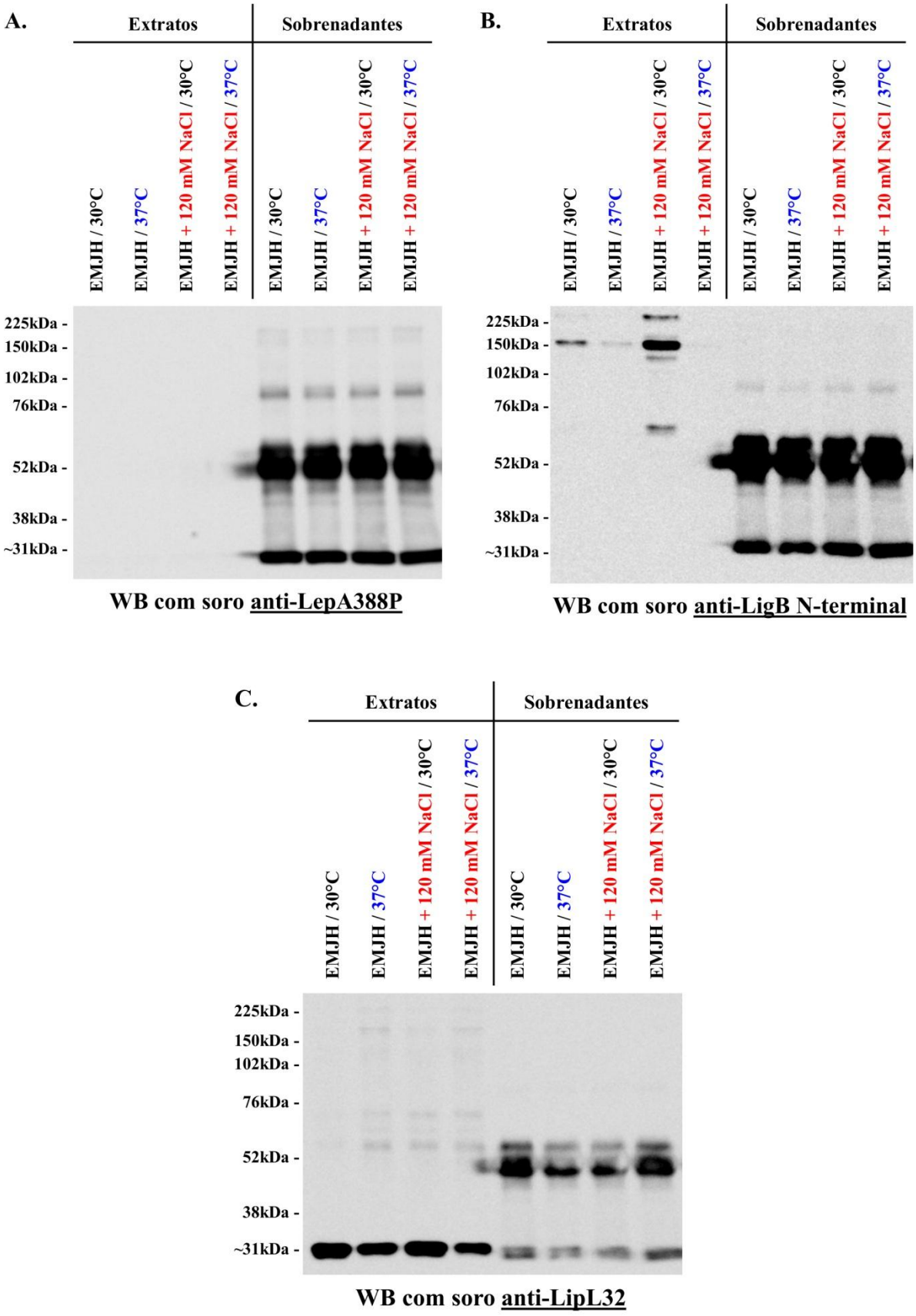


Figura 39. Detecção de proteínas nativas em bactérias *L. interrogans* cultivadas em diferentes condições de temperatura e osmolaridade, utilizando os antissoros contra as proteínas recombinantes

LepA388P, LigA, LigB e LipL32 por *Western Blotting*. Amostras com 200 µg de extratos e 35 µl de sobrenadantes imunoprecipitados foram aplicadas em SDS-PAGE e as proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. **A.** A membrana foi primeiramente submetida à incubação com o antissoro contra a proteína LepA388P diluído em 1:10.000. Após nova incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, as bandas foram reveladas com ECL Prime WB Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences®). **B.** Posteriormente, a mesma membrana foi submetida a "*stripping and reprobing*" com um antissoro contra a porção amino-terminal da proteína LigB (o qual também reconhece LigA por homologia), também diluído em 1:10.000, seguindo o mesmo protocolo realizado em (A). Em **C.**, a membrana foi novamente submetida a "*stripping and reprobing*", mas com um antissoro contra a proteína LipL32. As bandas correspondentes às cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas envolvidas na imunoprecipitação dos sobrenadantes possuem ~25 kDa e ~50 kDa, respectivamente, enquanto que as bandas correspondentes às proteínas LigA, LigB e LipL32 possuem 130 kDa, 200 kDa e 32 kDa, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

Phage display é uma metodologia de genômica funcional para triagem e identificação de interações proteínas-ligantes, e o uso de bibliotecas compostas por fragmentos de genomas microbianos completos (*shotgun phage display*) tem-se revelado bem sucedida na identificação de adesinas microbianas essenciais para colonização (MULLEN *et al.*, 2006; MUÑOZ-PROVENCIO & MONEDERO, 2011; ROSANDER *et al.*, 2011). O sequenciamento completo dos genomas de espécies patogênicas (*L. interrogans* e *L. borgpetersenii*) e de uma espécie saprofítica (*L. biflexa*), aliado à técnica de *phage display*, possibilitou a identificação de novas adesinas de leptospiras e suas interações com proteínas de matriz extracelular e/ou receptores de células presentes nos hospedeiros. Nosso grupo demonstrou a interação da proteína LigB à heparina/heparan sulfato e, adicionalmente, identificou a lipoproteína LIC12976, capaz de se ligar a células de mamíferos e à laminina (CHING *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2013). Coburn e colaboradores mostraram que *L. interrogans* se liga com maior eficiência a células do que à matriz extracelular *in vitro* e, através da técnica de *phage display*, este grupo identificou proteínas hipotéticas conservadas (LIC11574 e LIC13411), as quais se ligaram a VE-caderina, um receptor de células endoteliais para *L. interrogans* (EVANGELISTA *et al.*, 2014).

O objetivo deste trabalho foi contribuir para o crescente conhecimento sobre adesinas de leptospiras, a partir da identificação de novas proteínas candidatas por *shotgun phage display* e posterior seleção (*biopanning*) em cultura de células eucarióticas. Uma biblioteca que represente o genoma completo de uma determinada bactéria necessita possuir abundante número de clones, o que requer um vetor e fragmentos de DNA genômico de boa qualidade (JACOBSSON *et al.*, 2003). Para esse fim, algumas técnicas para a construção de bibliotecas

foram testadas e padronizadas antes da preparação de bibliotecas de maior escala para a seleção de possíveis adesinas.

A principal técnica avaliada foi a baseada na inserção de fragmentos genômicos no fagomídeo pG8SAET, através do sítio de restrição com extremidades cegas SnaBI (ligação *blunt-end*). A justificativa para o uso da ligação *blunt-end* é a manipulação mínima dos fragmentos genômicos, já que a adição de adaptadores e a clivagem dos fragmentos por enzimas de restrição não são necessárias antes da ligação ao vetor (CHEN & JANES, 2002; JACOBSSON *et al.*, 2003). Contudo, a utilização desta estratégia em trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório apresentou diversas limitações e, por esta razão, optamos por refinar algumas variáveis durante o processo de clonagem, a fim de melhorar a qualidade das bibliotecas resultantes. Os parâmetros mais importantes envolvidos na clonagem são a razão molar na relação vetor:inserto, que irá gerar maior número de clones com os insertos utilizados, e a garantia que o vetor não irá recircular sem insertos. Observamos que as maiores relações vetor:inserto testadas (1:3 e 1:6) foram as mais eficientes em número de clones com insertos, sendo priorizada a razão molar 1:6 devido ao maior número de clones totais (Figuras 15 e 16). Entretanto, o número de clones resultantes das ligações controles sem insertos (vetor digerido com ou sem ligase) se mostrou elevado em todos os testes, mesmo após duas reações de digestão e defosforilação do vetor pG8SAET, indicando que o tratamento do vetor foi ineficiente.

A principal desvantagem da ligação *blunt-end* é a ausência de associações intermoleculares específicas, como as pontes de hidrogênio existentes em extremidades coesivas complementares, as quais estabilizam temporariamente as estruturas e facilitam as ligações fosfodiéster realizadas pela enzima T4 DNA ligase. Mesmo na presença de grandes quantidades de T4 DNA ligase, a eficiência da clonagem entre DNAs com extremidades *blunt-end* é de 10 a 100 vezes menor que as eficiências atingidas em reações com DNA

portando extremidades coesivas (SAMBROOK & RUSSELL, 2001; FITZGERALD-HAYES & REICHSMAN, 2009). Dessa forma, técnicas alternativas baseadas na ligação com extremidades coesivas foram testadas em paralelo, com o intuito de aumentar a eficiência das ligações entre vetor e insertos. Contudo, nenhuma das duas estratégias avaliadas se mostrou mais eficientes do que a ligação *blunt-end*. A tentativa de obtenção de ORESTES (*"Open Reading frame Expressed Sequence Tags"*), técnica utilizada originalmente a partir de cDNAs, foi adaptada para a utilização de DNA genômico como molde. Porém, mesmo após diversas padronizações, não conseguimos obter fragmentos com padrão em arraste quando analisados em gel de agarose (Figura 19). Este padrão indicaria uma ampla representação do genoma, sem que algumas porções sejam especificamente selecionadas sobre outras (DIAS-NETO et al., 2000; CAMARGO et al., 2001; NUNES et al., 2004). As bandas apresentadas provavelmente representavam as abundantes regiões repetitivas presentes no genoma do parasita *Trypanossoma cruzi*, utilizado para as padronizações. É importante destacar que outro padrão de distribuição dos insertos amplificados pela técnica ORESTES poderia ser obtido com o DNA genômico de *L. interrogans*, em função de sua composição e sequência de nucleotídeos distintas do DNA genômico de *T. cruzi*. Mesmo assim, optamos por abandonar esta abordagem. Outra técnica testada foi a ligação de adaptadores em grampo aos fragmentos antes da ligação ao vetor. Os adaptadores utilizados possuíam um sítio de restrição para a enzima HindIII, mas, apesar da digestão com a enzima HindIII ter se mostrado mais eficiente para a digestão do vetor, não foi possível recuperar clones com insertos após a ligação, indicando que a defosforilação do vetor não impediu sua auto ligação, a qual foi possivelmente facilitada pelas extremidades coesivas deixadas pela enzima HindIII (Figura 20).

De acordo com os resultados obtidos com as padronizações das diferentes técnicas avaliadas, a construção de bibliotecas genômicas em maior escala foi conduzida através da

ligação *blunt-end* dos fragmentos de DNA ao vetor pG8SAET. Bibliotecas construídas pelo método de *shotgun* podem não atingir uma cobertura completa do genoma bacteriano utilizado devido à baixa eficiência de transformação de bactérias *E. coli* que limita o número de clones primários (aqueles que possuem insertos únicos) e à proporção de 1 em 18 clones possuírem insertos corretamente inseridos para a apresentação de proteínas fusionadas (MULLEN *et al.*, 2006). Perante tais restrições, estabelecemos um número mínimo ideal de clones para garantir uma boa qualidade para as bibliotecas, e o valor de $2{,}07 \times 10^7$ clones foi obtido pela consideração da proporção 1/18 de clones corretos, do genoma da cepa de *L. interrogans* utilizada (4,6 Mb), do tamanho médio dos fragmentos de DNA genômico (400 pb) e de uma cobertura suficiente do genoma (100 vezes). Entre as três bibliotecas construídas (BBT1, BBT2 e BBT3), apenas BBT2 e BBT3 apresentaram número ideal de clones, mesmo após análise dos clones por PCR e validação por sequenciamento (Figuras 21 e 22). Além de sua construção ser baseada em uma quantidade de vetor ~33,3% maior que a utilizada para a BBT1 (10 µg contra 7,5 µg), a bactéria *E. coli* TG1 utilizada na transformação para BBT2 e BBT3 possuía eficiência 10 vezes maior que a *E. coli* DH10B utilizada para a BBT1 (10^9 CFU/µg DNA contra 10^8 CFU/µg DNA), o que pode ter limitado o número de clones primários para a primeira biblioteca construída.

As seleções de ligantes a partir das bibliotecas foram baseadas na técnica BRASIL (*"Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands"*), a qual consiste na separação de fagos ligantes às células dos demais fagos livres em solução por uma centrifugação diferencial contendo uma fase orgânica não miscível, eliminando a necessidade de repetidas lavagens e impedindo a contaminação por fagos livres entre os fagos ligantes selecionados (GIORDANO *et al.*, 2001). O primeiro *biopanning* foi realizado com a BBT1, a fim de testar e padronizar a técnica BRASIL. Após quatro rodadas de seleção, foi observado um enriquecimento de clones vazios, principalmente na última rodada (Figura 23). Uma

possível explicação seria uma quantidade excedente de fagos adicionados às células (fagos *Input*), promovendo um excesso de seleção de clones da biblioteca. Sob estas condições, a pressão seletiva para a afinidade de ligação ao ligante utilizado se torna ineficiente, já que, em um determinado estágio, todos os clones possuem afinidade equivalente, levando à seleção de fagos inespecíficos (CLACKSON & LOWMAN, 2004). A análise dos fagos ligados às células (fagos *Output*) por PCR e sequenciamento resultou em nenhum clone em fase com a sequência sinal e a proteína VIII do fagomídeo (Figura 24). Quatro clones estavam em fase apenas com a pVIII, porém, a análise adicional de suas sequências revelou que elas não são originadas de proteínas expostas na superfície ou secretadas por leptospiras (Tabela 7 e Tabela A1 da seção Apêndices).

Com a finalidade de reduzir a seleção de clones vazios, a BBT2 foi escolhida para um novo *biopanning*, pois a biblioteca apresentou menor proporção de clones vazios (Figura 22). Neste *biopanning*, os fagos *Input* foram diluídos a cada rodada para evitar a seleção de fagos inespecíficos. Entre os fagos *Output* coletados nas três rodadas de seleção, havia baixa proporção de clones vazios (Figura 25). Entretanto, a análise dos clones por PCR e sequenciamento resultou em apenas um clone em fase com a sequência sinal e a pVIII, e o posterior estudo de sua sequência revelou que ela é originada de uma proteína hipotética citoplasmática e, portanto, pouco provável que esta proteína seja uma adesina. Por outro lado, entre os clones coletados a partir do mesmo *biopanning*, também havia dois clones apenas em fase com a sequência sinal e outros nove clones apenas em fase com a pVIII, e a verificação de suas sequências mostrou três proteínas hipotéticas que estariam expostas na superfície ou seriam secretadas por leptospiras, as quais foram denominadas LepA962, LepA069 e LepA388 (Figura 26; Tabela 8 e Tabela A2 da seção Apêndices).

Nos ensaios de *biopanning*-BRASIL realizados houve uma marcante seleção de clones fora de fase, mesmo após três ou quatro rodadas de seleção em células (Figura 26). Este

fenômeno também foi observado por outros grupos (CÁRCAMO *et al.*, 1998; JACOBSSON *et al.*, 2003) e uma provável explicação inclui a formação de fases abertas de leitura artificiais que agem como mimotopos. Um estudo realizado com bibliotecas de DNA cromossômico do parasita *Cowdria ruminantium* para seleção com anticorpos gerados contra MAP1, a maior proteína antigênica do parasita, mostrou que o gene codificador desta proteína foi eliminado da biblioteca e os peptídeos isolados após seleção eram fragmentos artificiais (FEHRSEN & DU PLESSIS, 1999). Outras possíveis explicações compreendem a correção da fase dos insertos selecionados através do deslocamento de ribossomos durante a tradução (*"ribosomal slippage"*) e os prováveis erros na detecção de sinais resultantes das reações de sequenciamento de cada clone. O tamanho médio dos insertos fusionados à pVIII também influenciam no número de clones em fase selecionados. A média dos fragmentos selecionados nos *biopannings* realizados foi de aproximadamente 300 pb, tamanho que pode ter acarretado em uma redução na viabilidade dos fagos resultantes (CLACKSON & LOWMAN, 2004; TIKUNOVA & MOROZOVA, 2009).

Por outro lado, o número de clones coletados ao longo das rodadas de seleção deve apresentar um aumento de 50 a 1.000 vezes, comparado à primeira rodada (JACOBSSON *et al.*, 2003). Em nossos experimentos, apenas foi observado um leve enriquecimento no número de clones obtidos nas rodadas de seleção com a BBT2, observação igualmente realizada em outro estudo utilizando bibliotecas de *phage display* (MULLEN *et al.*, 2007). Adicionalmente, um verdadeiro resultado positivo obtido nas seleções com bibliotecas genômicas é caracterizado pelo isolamento de clones com sequências derivadas do mesmo gene e preferencialmente sobrepostas, garantindo assim a interação entre o ligante e uma determinada sequência (JACOBSSON *et al.*, 2003). Este quadro não foi observado em nossas análises, possivelmente devido ao limitado número de clones avaliados por sequenciamento. Entretanto, houve um único episódio de repetição no *biopanning* com a BBT2: na primeira

rodada de seleção, um clone considerado fora de fase (Fago 1.2) apresentou uma sequência que se sobrepunha à sequência presente no Fago 3.21, a qual estava em fase apenas com a pVIII (Figura A2 da seção Apêndices). Ambos os clones possuem fragmentos do gene codificador da proteína LepA069, classificada como exposta/secretada em leptospiras e, portanto, apesar de não estarem em fase com a sequência sinal e a pVIII como esperado, a seleção destes clones pode representar um provável indício de que houve enriquecimento da proteína LepA069 durante as rodadas de seleção com a BBT2. A sequência da proteína LepA069 foi estudada para a elaboração de oligonucleotídeos, a fim de amplificar algumas porções para clonagem no vetor de expressão pAE.

A proteína LepA962, também selecionada a partir do *biopanning* da BBT2, é classificada como uma lipoproteína hipotética e, inicialmente, ela foi considerada como uma proteína sem função conhecida. Desse modo, sua sequência foi igualmente estudada para amplificação e clonagem de algumas porções no vetor de expressão pAE. Contudo, estudos mais detalhados revelaram que esta proteína já havia sido descrita como Lp95, lipoproteína com 95 kDa que mostrou ser capaz de se ligar a componentes da matriz extracelular como laminina e fibronectina, além de ativar E-selectina em células endoteliais (ATZINGEN *et al.*, 2009). A proteína se encontra conservada em importantes sorovares patogênicos de *L. interrogans* (como Copenhageni, Canicola, Hardjo e Icterohaemorrhagiae) e, em cobaias experimentalmente infectadas com leptospiras, a proteína foi identificada no lúmen de túbulos renais e em infiltrados de células inflamatórias nos rins, sugerindo sua expressão durante a infecção em animais. A porção carboxi-terminal da proteína Lp95 clonada em fusão com o antígeno DnaK mostrou atividade imunogênica nos níveis humoral e celular, através de alta produção de IgG total, indução da proliferação celular de linfócitos e níveis aumentados de IL-10 em camundongos BALB/c (ATZINGEN *et al.*, 2014). Em conjunto, estes dados indicam o funcionamento da técnica de *phage display*, apesar deste inserto estar em fase

apenas com a sequência sinal no Fago 2.10 selecionado. É possível que um dos mecanismos descritos acima explique a seleção desta proteína durante o *biopanning* da BBT2.

A terceira proteína selecionada foi a LepA388, cuja sequência estava em fase apenas com a pVIII no Fago 3.25. Curiosamente, a sequência clonada neste fago apresentou identidade igual ou superior a 60% com outras 11 proteínas, denominadas neste trabalho por LepA835, LepA589, LepA934, LepA490, LepA271, LepA639, LepA769, LepA620, LepA628, LepA400 e LepA402 (Tabela 9). Todas as proteínas são hipotéticas e, portanto, ainda não possuem função conhecida. No entanto, foi possível identificar algumas características por programas de predição que são compartilhadas entre elas, como massa molecular semelhante (71,1 a 74,6 kDa), a presença de peptídeo sinal e/ou região transmembrana e uma possível função extracelular. O compartilhamento de um domínio de função desconhecida (chamado neste trabalho de DUF_61) se destacou durante as análises, indicando a formação de uma família de proteínas parálogas em *L. interrogans*. O estudo do domínio DUF_61 permitiu a identificação de uma 13ª proteína, a LepA591, a qual parece ser uma forma truncada que se alinha à porção carboxi-terminal das outras 12 proteínas (Figura 27). O alinhamento múltiplo entre as 13 proteínas da família DUF_61 mostrou que a sequência presente no Fago 3.25 se encontra na porção amino-terminal, a qual é a mais conservada entre as proteínas. Adicionalmente, a presença de resíduos de cisteína em posições invariáveis foi observada, sugerindo que as proteínas possuam estruturas terciárias semelhantes a partir da formação de pontes dissulfeto em padrão conservado (Figura 27). Uma característica interessante do domínio DUF_61 é a sua presença apenas em espécies patogênicas de *Leptospira*, principalmente as espécies mais virulentas e capazes de causar doenças mais severas (LEHMANN *et al.*, 2014). A quantidade de proteínas parálogas varia entre as espécies desde 2 proteínas em *L. alexanderi* e *L. santarosai*, até 13 proteínas em *L.*

interrogans e L. noguchii (dados coletados da plataforma online InterPro - www.ebi.ac.uk/interpro/).

A presença desta família foi analisada recentemente em *L. interrogans* (sorovar Lai cepa 55601), em que foram comparados os genomas da forma selvagem e da bactéria atenuada após 19 passagens em cultura (LEHMANN *et al.*, 2013). Neste trabalho, foram identificados alguns variantes não sinônimos de nucleotídeo único (nsSNVs) e, após seleção de regiões codificadoras restritas a espécies patogênicas de *Leptospira*, foram encontrados dois genes pertencentes a esta família de proteínas parálogas. No sorovar Lai estão presentes 12 membros desta família, os quais foram analisados para expressão *in vivo* em hamsters infectados com bactérias selvagens e virulentas do mesmo sorovar. Todos os membros da família apresentaram aumento na expressão no sangue e fígado dos animais infectados por RT-PCR, sendo que os maiores níveis de expressão foram exibidos pelos genes codificadores das proteínas ortólogas a LepA490 e LepA388 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. O grupo também confirmou a presença dos membros da família DUF_61 apenas em espécies patogênicas de *Leptospira* e as proteínas ortólogas a LepA835 e LepA402 apresentaram maior representatividade entre as espécies selecionadas para análise (LEHMANN *et al.*, 2013).

As proteínas pertencentes à família paráloga DUF_61 apresentam características muito semelhantes em um mesmo organismo e, apesar da aparente redundância, evidências experimentais sugerem que as proteínas desta família podem realizar funções diferentes. O trabalho realizado por Marcsisin e colaboradores analisou a atenuação *in vivo* de mutantes de leptospiras (*L. interrogans* sorovar Lai) por transposons, e um dos mutantes mostrou uma inserção no gene codificador da proteína ortóloga a LepA589 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Este mutante perdeu a capacidade de colonização em rins de camundongos, e no modelo de infecção aguda em hamsters apresentou uma atenuação marginal, pois houve um retardamento significativo na morte dos animais infectados (MARCSISIN *et al.*, 2013).

Outra característica interessante apresentada pelo domínio DUF_61 é a sua presença restrita a bactérias espiroquetas do gênero *Leptospira* e algumas espécies do grupo não relacionado de proteobactérias. Aproximadamente 10% das proteínas que possuem o domínio DUF_61 pertencem às subdivisões α-, γ e ε-proteobactérias. Depois das leptospiras, as bactérias que possuem mais proteínas com este domínio são α-proteobactérias do gênero *Bartonella* (*B. australis* e *B. bacilliformis*) (dados coletados da plataforma online InterPro - www.ebi.ac.uk/interpro/). Espécies de *Bartonella* são bactérias gram-negativas fastidiosas e a primeira espécie descrita foi *B. bacilliformis,* bactéria endêmica da América do Sul, a qual possui os humanos como reservatórios e causam infecções que datam desde a dinastia dos Incas. A bartonelose provocada por *B. bacilliformis* é transmitida por flebotomídeos (conhecidos como mosquito-palha) e é caracterizada pela doença de Carrión, condição bifásica constituída por uma anemia hemolítica devastadora na fase aguda (febre Oroya) e tumores vasculares na fase crônica (verruga peruana) (GUPTILL, 2010; KAISER *et al.*, 2011). *B. australis* foi isolada de cangurus em Queensland (Austrália) e ainda não são conhecidos casos de infecção em humanos por esta bactéria (FOURNIER *et al.*, 2007). A expansão da família paráloga DUF_61 em espécies patogênicas de *Leptospira* e nas duas espécies de *Bartonella* sugere que ancestrais destes patógenos coexistiram, permitindo a transferência genética entre eles. Adicionalmente, análises filogenéticas da família DUF_61 indicam uma origem comum e revelaram uma grande divergência nos membros de *Bartonella* (LEHMANN *et al.*, 2013) A família DUF_61 também está presente em bactérias patogênicas responsáveis por doenças gástricas e enterohepáticas em animais e/ou humanos, como espécies não pilóricas do gênero *Helicobacter*, espécies de *Campylobacter* e a espécie *Piscirickettsia salmonis* (O'ROURKE *et al.*, 2001; FRYER & HEDRICK, 2003; KERSULYTE *et al.*, 2013; MÉNARD *et al.*, 2014; KAAKOUSH *et al.*, 2015).

As evidências experimentais publicadas nos levaram a priorizar a análise da proteína LepA388 e de outras proteínas da família paráloga DUF_61. Porções da proteína LepA388 (LepA388P, LepA388NR e LepA388F) foram clonadas no vetor de expressão pAE, baseadas nas regiões de maior similaridade entre as proteínas no alinhamento múltiplo realizado (Figura 28). A sequência consenso resultante do alinhamento múltiplo foi também utilizada para um novo alinhamento (BLASTp), permitindo a identificação das proteínas com maior (LepA271) e menor (LepA402) similaridade (Tabela 10), e as sequências para codificar as duas proteínas completas sem o peptídeo sinal/região transmembrana foram clonadas no vetor pAE, assim como realizado para as porções da proteína LepA388.

A expressão das três porções da proteína LepA388 em bactérias *E. coli* BL21 SI ou BL21 Star(DE3)-pLysS foi bem sucedida, porém, mesmo após alguns testes, as proteínas permaneceram insolúveis em corpúsculos de inclusão nas bactérias, após indução da expressão (Figuras 30 e 31). Sob condições de estresse, como na superexpressão de proteínas, a maquinaria bacteriana responsável pelo dobramento de proteínas se torna saturada, promovendo dobramentos incorretos e a consequente formação de agregados proteicos (FERRER-MIRALLES *et al.*, 2014; ROSANO & CECCARELLI, 2014). A probabilidade de dobramentos incorretos é bastante aumentada nas porções recombinantes da proteína LepA388, pois estas são ricas em resíduos de cisteína e sua correta conformação depende da formação de pontes dissulfeto com pares de cisteína específicos. Formas agregadas são tipicamente desnaturadas e dissolvidas em altas concentrações de agentes caotrópicos, como a ureia ou hidrocloreto de guanidina, utilizados para reduzir as interações não-covalentes entre moléculas proteicas. No caso de proteínas ricas em resíduos de cisteína, agentes redutores como β-mercaptoetanol são adicionados para diminuir a formação de pontes dissulfeto intra- e/ou intermoleculares (THOMSON *et al.*, 2012; YAMAGUCHI & MIYAZAKI, 2014). As

porções da proteína LepA388 somente foram solubilizadas eficientemente em tampão contendo 8 M de ureia e 5 mM de β-mercaptoetanol (Figura A5 da seção Apêndices).

A renaturação das proteínas recombinantes de LepA388 foi testada primeiramente através de diálise gradual. Durante a remoção gradativa dos agentes desnaturantes por diálise, algumas moléculas podem se dobrar de maneira incorreta ou gerar agregados, porém, concentrações intermediárias de desnaturantes podem permitir a interconversão de moléculas proteicas em suas estruturas nativas e com as pontes dissulfeto corretas (TSUMOTO *et al.*, 2003). A diálise gradual realizada com as porções da proteína LepA388 resultou na precipitação das proteínas durante o processo (Figura 32). Um estudo recente apontou que, apesar da diálise gradual ser mais eficiente que a retirada em um único passo do agente desnaturante utilizado, há um predomínio de proteínas agregadas em concentrações medianas do desnaturante (HO *et al.*, 2003), o que pode explicar o ocorrido com as nossas proteínas.

Outra estratégia para a solubilização e renaturação de proteínas a partir de corpúsculos de inclusão é a utilização de altas pressões hidrostáticas, as quais promovem a hidratação de resíduos hidrofóbicos e carregados presentes nas proteínas e desfavorecem as interações hidrofóbicas e eletrostáticas intermoleculares (LEE *et al.*, 2006). A técnica tem se mostrado eficiente para a renaturação de diversas proteínas (FRAGA *et al.*, 2010; MALAVASI *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2014; LEMKE *et al.*, 2015) e, portanto, ela foi empregada na tentativa de renaturar as porções da proteína LepA388. Após diferentes condições para a renaturação, o tratamento com o tampão composto por 50 mM Tris-EDTA pH 8,0 e 500 mM de L-arginina pH 11,0 foi o mais eficiente para que a maior concentração das proteínas estivesse na fração solúvel (Figura 33 e Figura A6 da seção Apêndices). Por outro lado, existe a possibilidade de que o pH extremamente alcalino neste tratamento possa ter apenas solubilizado as proteínas e, mesmo após a diálise para remover a L-arginina das soluções com as proteínas, o pH foi mantido em alcalinidade (em torno de 8,8-9,0), pois

tentativas de diminuir o pH resultaram em precipitação das proteínas recombinantes (dados não apresentados).

Em face das dificuldades encontradas não só para a expressão em níveis suficientes das proteínas LepA388NR e LepA388F, como também para a renaturação de todas as porções da proteína LepA388, apenas a proteína LepA388P (com a sequência presente no fago) solubilizada em ureia e β-mercaptoetanol foi priorizada para purificação e posterior obtenção de anticorpos em camundongos. A purificação por coluna de afinidade a níquel (Ni^{2+}) foi realizada com a manutenção da alta concentração de ureia (8 M) e 5 mM de β-mercaptoetanol ao longo do processo, o qual foi bem sucedido para eluir a proteína LepA388P com a adição de aproximadamente 250 mM de imidazol (Figura 34 e Figura A7 da seção Apêndices). A proteína purificada foi utilizada para a imunização de camundongos e os soros obtidos após três e quatro doses da proteína mostrou que LepA388P é altamente imunogênica, pois o título obtido pelo seu antissoro atingiu 1:64.000 e 1:128.000 em ELISA, respectivamente. O antissoro foi posteriormente avaliado em ensaios de *Western Blotting*, onde foi possível observar a especificidade do antissoro pela proteína LepA388P, em comparação a outras proteínas recombinantes de leptospiras (Figura 37). As proteínas escolhidas foram: LipL32, proteína de maior representação na membrana externa das bactérias (KO *et al.*, 2009); LIC10009, lipoproteína putativa que não possui função de adesina (BARBOSA *et al.*, 2006); HlyX, hemolisina putativa caracterizada em nosso laboratório (HAUK *et al.*, 2005).

Contudo, não foi possível detectar a presença das proteínas nativas da família DUF_61 em diferentes extratos de leptospiras patogênicas (Figura 38). Este resultado pode refletir que a expressão das proteínas da família paráloga somente é induzida durante a infecção das leptospiras patogênicas em animais. Este fenômeno foi observado no trabalho realizado por Lehmann e colaboradores, em que os membros da família testados apresentaram níveis de expressão elevados nos ensaios *in vivo*, em comparação à expressão nas leptospiras em

condições normais de cultura (LEHMANN *et al.*, 2013). Adicionalmente, os membros da família LepA400 e LepA402 mostraram sua expressão gênica fortemente induzida sob condições de osmolaridade fisiológica, apresentando a possibilidade das proteínas pertencentes à família DUF_61 serem individualmente reguladas por diferentes estímulos durante o curso da infecção (MATSUNAGA *et al.*, 2007). Assim, mesmo não observando a expressão da LepA388 e de outros membros da família DUF_61 nos extratos das bactérias cultivadas *in vitro*, é possível que estas sejam expressas *in vivo* e tenham um papel relevante durante a infecção.

Por outro lado, as proteínas poderiam ser secretadas pelas bactérias logo após sua expressão, sendo somente possível observá-las na fração do sobrenadante das culturas, a qual é geralmente eliminada durante o processamento dos extratos de leptospiras. Matsunaga e colaboradores demonstraram a presença da forma secretada da proteína LigA nos sobrenadantes de culturas, e a expressão das proteínas LigA e LigB apresentou níveis aumentados após cultivo *in vitro* de leptospiras a 37°C e com adição de 80-120 mM de NaCl, condições que mimetizam o ambiente presente na infecção de hospedeiros (MATSUNAGA *et al.*, 2005; MATSUNAGA *et al.*, 2013). Contudo, a partir da realização de um experimento semelhante, em que bactérias *L. interrogans* foram cultivadas em meio EMJH ou EMJH com adição de 120 mM de NaCl, a 30°C ou 37°C (Tabela 6 da seção Material e Métodos), não foi possível detectar a expressão *in vitro* da proteína LepA388 e dos outros membros da família paráloga DUF_61 (Figura 39). Estudos adicionais envolvendo a análise de expressão in vivo podem contribuir para uma melhor determinação das condições de expressão das proteínas desta família, assim como seu papel na infecção de leptospiras no hospedeiro.

É importante salientar que o nosso esforço de caracterizar os membros da família paráloga DUF_61, em especial a proteína LepA388, é justificado, pois caso seja confirmada a sua importância durante a infecção, esta proteína seria um candidato vacinal a ser testado.

Adicionalmente, por ser um membro de uma grande família, a proteína LepA388 seria um potencial antígeno diagnóstico, principalmente se houvesse reatividade cruzada entre os membros da família DUF_61.

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foram testadas diferentes metodologias para a construção de bibliotecas genômicas, a fim de expor peptídeos randômicos na superfície de bacteriófagos (*shotgun phage display*). Apesar das dificuldades encontradas, a técnica de ligação *blunt-end* se mostrou mais eficiente em número de clones positivos e, portanto, foi utilizada para a construção de três bibliotecas em maior escala (BBT1, BBT2 e BBT3), entre as quais duas atingiram o número mínimo ideal de clones esperado.

A seleção de fagos ligantes realizada em células eucarióticas, através da técnica BRASIL, resultou em clones cuja maioria era consistida em sequências fora de fase. Entretanto, foram selecionadas algumas proteínas hipotéticas com características muito interessantes para posteriores análises, as quais foram denominadas LepA962, LepA069 e LepA388, sendo possivelmente secretadas pela bactéria ou localizadas em sua membrana externa.

LepA962 é uma lipoproteína já descrita como Lp95, a qual é capaz de interagir com componentes da matriz extracelular e receptores celulares. LepA069 é uma proteína hipotética cuja sequência estava presente em dois clones distintos que, apesar de não estarem em fase com a sequência sinal no fago, sugerem uma possível seleção da sequência sobreposta entre eles. Finalmente, a proteína LepA388 foi a mais estudada, pois o alinhamento da sequência presente no fago nos levou ao reconhecimento da família paráloga DUF_61, cujas proteínas estão presentes somente entre as espécies patogênicas mais virulentas de *Leptospira*. Assim, o conjunto dos resultados mostra que a técnica de *shotgun phage display* constitui uma estratégia complexa, mas que pode revelar novos alvos e antígenos. As proteínas identificadas neste trabalho parecem ser suficientemente interessantes para merecerem uma investigação mais detalhada.

A expressão heteróloga de três porções da proteína LepA388 (LepA388P, LepA388NR e LepA388F) resultou no acúmulo das proteínas recombinantes em corpúsculos de inclusão, fato que, aliado ao elevado número de resíduos de cisteína em suas sequências, tornou sua renaturação bastante complexa, não sendo possível obtê-las como proteínas solúveis a partir das técnicas utilizadas.

Devido às limitações encontradas, somente a porção LepA388P foi utilizada para imunização de camundongos, mostrando-se altamente imunogênica e resultando na obtenção de antissoros com altos títulos. Experimentos com o antissoro revelaram sua especificidade pela proteína recombinante, mas não foi possível detectar a presença das proteínas parálogas nativas em extratos de diferentes sorovares de *Leptospira*. Adicionalmente, a expressão destas proteínas em bactérias cultivadas sob diferentes condições *in vitro* não foi observada em amostras de extratos e sobrenadantes das culturas. Análises complementares envolvendo a expressão *in vivo* dos membros da família paráloga DUF_61 são necessários para uma compreensão mais ampla de sua função, assim como seu possível papel na patogênese da leptospirose.

Não obstante, a presença desta família de proteínas em leptospiras patogênicas é bastante intrigante. Em vários modelos de infecção, antígenos parálogos relacionados são em geral fatores de virulência, os quais estão envolvidos com mecanismos de evasão do sistema imunológico e, muitas vezes, possuem papel de adesinas (MATSUNAGA *et al.*, 2003; TEMPLETON, 2009; AKHTER *et al.*, 2012; DE PABLOS & OSUNA, 2012; DE GROOT *et al.*, 2013). Ainda que preliminar, a caracterização desta família de proteínas parálogas é uma evidente contribuição deste trabalho, além da identificação dos outros antígenos aqui relatados.

7. APÊNDICES

Tabela A1

Análise da localização subcelular das proteínas de *L. interrogans* cujas sequências estão em fase com pVIII, a partir do *biopanning*-BRASIL da BBT1. Os quatro programas de predição utilizados estão especificados.

Fago	Nome da proteína	LocTree3	Gneg-mPLoc	CELLO	PSORTb 3.0
1.2	LepA180	**Secretada (93%)**	Membrana interna	Citoplasma	Indefinida
2.9	LepA176	Membrana interna (89%)	Membrana interna/ Citoplasma	Membrana externa/ Citoplasma	Membrana interna
2.23	LepA658	Membrana interna (89%)	Membrana interna/ Citoplasma	Membrana externa	Indefinida
3.16	LepA692	Membrana interna (88%)	Membrana interna	Membrana externa	Indefinida

Tabela A2

Análise da localização subcelular das proteínas de *L. interrogans* cujas sequências estão em fase com a sequência sinal e/ou com pVIII, a partir do *biopanning*-BRASIL da BBT2. Os quatro programas de predição utilizados estão especificados. Em destaque, estão as proteínas expostas na bactéria e confirmadas pelos programas de predição.

Classificação dos clones	Fago	Nome da proteína	LocTree3	Gneg-mPLoc	CELLO	PSORTb 3.0
Positivo	**1.3**	LepA483	Citoplasma (89%)	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma
Em fase com a sequência sinal	**2.10**	LepA962	**Secretada (97%)**	**Membrana interna/ Extracelular**	**Membrana externa**	**Membrana externa**
	2.21	LepA035	Citoplasma (98%)	Membrana interna/ Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma
Em fase com a pVIII	**1.7**	LepA159	Citoplasma (98%)	Membrana interna/ Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma
	1.36	LepA872	Membrana interna (89%)	Citoplasma	Citoplasma	Membrana interna
	2.13	LepA351	Membrana interna (90%)	Membrana interna	Membrana externa/ Membrana interna/ Periplasma	Indefinida
	2.21	LepA036	Citoplasma (88%)	Citoplasma	Citoplasma/ Membrana externa	Membrana interna
	3.10	LepA677	**Secretada (93%)**	Membrana interna/ Membrana externa	Citoplasma	Indefinida
	3.21	LepA069	**Secretada (91%)**	**Membrana externa**	**Membrana externa**	**Membrana externa**
	3.25	LepA388	**Secretada (97%)**	**Membrana interna/ Extracelular**	**Membrana externa**	**Indefinida**

Tabela A2 - Continuação

Classificação dos clones	Fago	Nome da proteína	LocTree3	Gneg-mPLoc	CELLO	PSORTb 3.0
Em fase com a pVIII	**3.35**	LepA294	Citoplasma (98%)	Membrana interna	Citoplasma	Citoplasma
	3.36	LepA096	Citoplasma (97%)	Membrana interna/ Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma

```
                                                                                   LepA962NR/>
ATG AAC TAT ATA CTT GTA TGT ATT ATG ACC GTA TAT CTA GTG TTA GGT TGT AAT ACA AAA TCT CAA   (66)
 M   N   Y   I   L   V   C   I   M   T   V   Y   L   V   L   G   C   N   T   K   S   Q     22

|     /LepA962F      >
AAC AAC CCT TTT TTC TTT TCT AAC TTC GCG GAC TCA ATT TTA AAT CTG GTC CAT AAT CCG TCT AAC  (132)
 N   N   P   F   F   F   S   N   F   A   D   S   I   L   N   L   V   H   N   P   S   N     44

ACA CAT CTT TCG AGC TTT GAC TGC GCC CCT TCT TAC GAT TCC TCC AAA GGA TAC GTT TAT ATC CTA  (198)
 T   H   L   S   S   F   D   C   A   P   S   Y   D   S   S   K   G   Y   V   Y   I   L     66

AAT TCT TAC GGA CTT TCC TGC GAA CGT CTT TCC GTT CCT TCC GGT GAA CAA CTC AGC GTT TTG GCC  (264)
 N   S   Y   G   L   S   C   E   R   L   S   V   P   S   G   E   Q   L   S   V   L   A     88

TAC CCA CCG GCT AAC GCA AGA TTT GCG GAC TAT TTA CTA ATC TGG AAA GAT CTT ACG CCC CAA GAA  (330)
 Y   P   P   A   N   A   R   F   A   D   Y   L   L   I   W   K   D   L   T   P   Q   E    110

CTT TCT AAC TAT CAA AAC GGT ATC CTT CCT CCT CAA ACC AAA CAC ATG GAC TCA AAA GAC ATT ACG  (396)
 L   S   N   Y   Q   N   G   I   L   P   P   Q   T   K   H   M   D   S   K   D   I   T    132

GAA ATT TCC GAT CTA AGA CCT ACG GGA TCC GCC TAT CAG ATG AGT ATT TCC ACT CTC AAT TGG TCT  (462)
 E   I   S   D   L   R   P   T   G   S   A   Y   Q   M   S   I   S   T   L   N   W   S    154

CCA GGA ACT TAT ACT CTT GCG ATG CAA GGG GAT CCA CAA ACT CAG TAC CCG ACC GTC ACG GAA AAC  (528)
 P   G   T   Y   T   L   A   M   Q   G   D   P   Q   T   Q   Y   P   T   V   T   E   N    176

GTC ACC ATC TCT TCC GTT GTA GAT TCT ACG TTT AAC AAC ATT ATC AAC GAT ATG ATC ACC AAC AAT  (594)
 V   T   I   S   S   V   V   D   S   T   F   N   N   I   I   N   D   M   I   T   N   N    198

CGA GAC GCA TAT ATT TAT TCA AAC GGT AAT CCG GTT TCA AGC TCT TCA AAA CTT TAC CGT GGA AAT  (660)
 R   D   A   Y   I   Y   S   N   G   N   P   V   S   S   S   S   K   L   Y   R   G   N    220

ACT TAT ATT TTT GCT TTA AAC CTA AAT AAA ATC AAA ACC GTA AAG AAC GAG GTC TCG GTG GAT TAT  (726)
 T   Y   I   F   A   L   N   L   N   K   I   K   T   V   K   N   E   V   S   V   D   Y    242

ATT AAG CTG TTA GGT GAA TTC ACG CTT AAT TCT GGA ATG CTT AAG TTA CAT TTG GTT CCC ACT AAT  (792)
 I   K   L   L   G   E   F   T   L   N   S   G   M   L   K   L   H   L   V   P   T   N    264

AAA AAA TCA AGA ATC AGC ACG GAA TGT TCA ACC ACT TCC GAT TTC CCG GTT TCC ATT TCC AAT TAT  (858)
 K   K   S   R   I   S   T   E   C   S   T   T   S   D   F   P   V   S   I   S   N   Y    286

CCT CAG GGA ATT CTT ACA GTC CGT TTT CAA ACT CCT CCT TCT ATT AAA TTC TAC CAT GCA GAT GAA  (924)
 P   Q   G   I   L   T   V   R   F   Q   T   P   P   S   I   K   F   Y   H   A   D   E    308

AAT ATC TTT AGT TTC AAG ATT TAT CAT AAC GCA CCT TCG GAC TGT TCT TCT GGC AGT AAT AAA ACT  (990)
 N   I   F   S   F   K   I   Y   H   N   A   P   S   D   C   S   S   G   S   N   K   T    330

                                <        LepA962NR      TTA
ACG GAA TTT TCA AGA AAC ATC ATA GAC CTT CAT ACT GCC GAA ACT CCC ATA CCC GTA AAC GCG GCG (1056)
 T   E   F   S   R   N   I   I   D   L   H   T   A   E   T   P   I   P   V   N   A   A    352

GGA CCT CTG GAT ACG ATC AAA ATC CGT ATC GTT CGA TTC GGA GAT ACT CAA TTT ACT ACA AAC GAT (1122)
 G   P   L   D   T   I   K   I   R   I   V   R   F   G   D   T   Q   F   T   T   N   D    374

TCC TTA ACT TCT TGG GGA AAT ATT CTC ACT TCT GAA TTT TAC GAA GCC ACT AAA AAA TAT TTC AAA (1188)
 S   L   T   S   W   G   N   I   L   T   S   E   F   Y   E   A   T   K   K   Y   F   K    396

                                   |         LepA962P      >
TTG GAA ATC CAA GGG ATC CAA AAT TTT TCT ATG ATT CAA CCG GAT CTC AAT CAG GCC TTA GTT GAA (1254)
 L   E   I   Q   G   I   Q   N   F   S   M   I   Q   P   D   L   N   Q   A   L   V   E    418

AAC TGG TAT AAC ACA AGA CCC AAA ACT CCT GGA AAA ACT CCT CTC AAT TTG AAC AAC CCG GAT GAA (1320)
 N   W   Y   N   T   R   P   K   T   P   G   K   T   P   L   N   L   N   N   P   D   E    440

CGC CTT CTG GCT ACG ATG TTG TAT TAC GAA TTC AAT CAA ACA AAA TTG CTC ACG GAT TTA GAG ATC (1386)
 R   L   L   A   T   M   L   Y   Y   E   F   N   Q   T   K   L   L   T   D   L   E   I    462

CTT TAT CCC ATT CGC CAA AAT GGA GAA GAC GTT ACC CTA TAT ATA TCA GAC TTT TCT AAA ATC CAA (1452)
 L   Y   P   I   R   Q   N   G   E   D   V   T   L   Y   I   S   D   F   S   K   I   Q    484

GGA GGG GCT TAC GCA ACT TCC AAC GCT CAA TTG GGA CAA TCA ATT GTT CCT ATT ACG AAT GTT TAT (1518)
 G   G   A   Y   A   T   S   N   A   Q   L   G   Q   S   I   V   P   I   T   N   V   Y    506

TTA GCG ACG TAT TCG GAT GCA AAC ATT ATA GAT ACG AGA GTT TTC CAT ACT ATA ACA AAC GGA ACG (1584)
 L   A   T   Y   S   D   A   N   I   I   D   T   R   V   F   H   T   I   T   N   G   T    528

ACT ACC TTC CAC TTC GAT CCT ACT TTC TAT CAG CCT TGT TTA GGT TGT CCT CCA AGC GTT GCA AAC (1650)
 T   T   F   H   F   D   P   T   F   Y   Q   P   C   L   G   C   P   P   S   V   A   N    550

GCA ACG GAA TAC GTA GAA GTG ATG AGA CAA AGA AAT CTA CAA TAC ACG TCC CAA AAT ATT TCA ATT (1716)
 A   T   E   Y   V   E   V   M   R   Q   R   N   L   Q   Y   T   S   Q   N   I   S   I    572
```

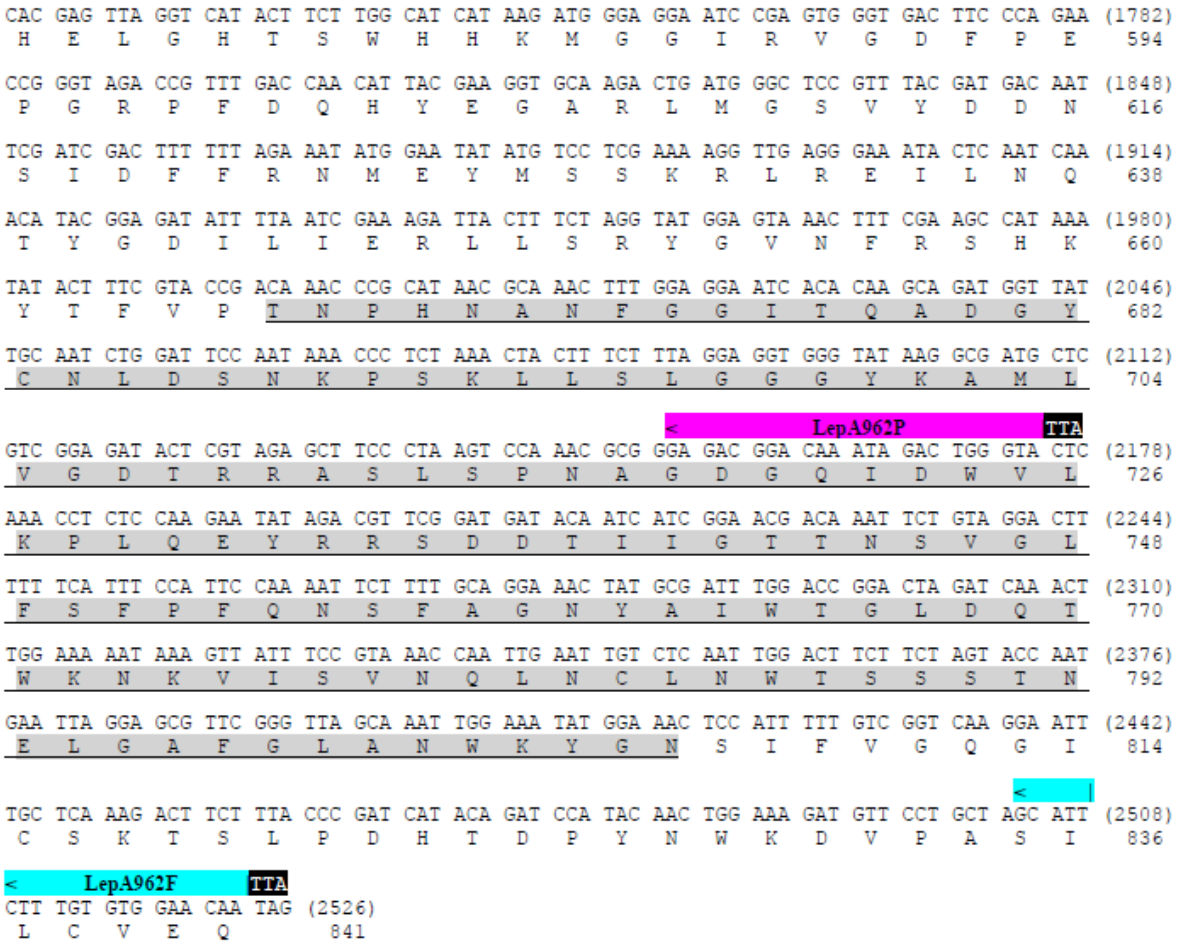


Figura A1. Sequências nucleotídica e peptídica da proteína LepA962. Na figura, estão destacadas as posições do peptídeo sinal e/ou da região transmembrana da proteína (*azul*), do possível *lipobox* (*vermelho*), da sequência apresentada pelo fago 2.10 (*amarelo*), do domínio de função desconhecida *DUF_54* (*cinza*) e dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação das sequências selecionadas para clonagem (LepA962F e LepA962NR em *verde*, LepA962P em *rosa*, LepA962F em *azul claro*).

```
GTG GAA ATA TTT AAA CGT CAT TTT CAA AAA CAT AAA ACA GTT TAT TTT TTC CTA CTC AGT CTA TTC   (66)
 M   E   I   F   K   R   H   F   Q   K   H   K   T   V   Y   F   F   L   L   S   L   F    22

ATC ATT TAC AAA CTT GTC TTT AAC CGT TAT ACG GGA CAG CTT TTA CTT CCC AAA ATA TTG CAG GGT  (132)
 I   I   Y   K   L   V   F   N   R   Y   T   G   Q   L   L   L   P   K   I   L   Q   G    44

|          LepA069NR / LepA069F          >
TCT ATA CGA GGC TCT GCT AAC TTT ACT GTA ACT AAA TTT TCT CTT TTT TAT GGG ATT GCG TTT GAA  (198)
 S   I   R   G   S   A   N   F   T   V   T   K   F   S   L   F   Y   G   I   A   F   E    66

GAC TTA GTA CTC AAA TCA GAT TCA ACT TTT GAA GAA CGC CCG GTT CTT TCC GTA AAA GAG TTG GAA  (264)
 D   L   V   L   K   S   D   S   T   F   E   E   R   P   V   L   S   V   K   E   L   E    88

CTT TCT TAC AAT TTA CCT TGG ATT TTA TTG GGA AGG GCG AAA TTA TCT AAA ATT GCA ATC GTA GGA  (330)
 L   S   Y   N   L   P   W   I   L   L   G   R   A   K   L   S   K   I   A   I   V   G   110

CTT AAG ATA GAT CTC AGA CAA AAA AGT GGA GAA TGG AAT CTA TCA AAA TTA TTT CCT ACT TCT TCT  (396)
 L   K   I   D   L   R   Q   K   S   G   E   W   N   L   S   K   L   F   P   T   S   S   132

CAA CCT TCT GAG GAA GAA AAA ACG TCA TCT TCT TCT TTA GAA GAA ATA TCT ACG ATC CTT CCT GTC  (462)
 Q   P   S   E   E   E   K   T   S   S   S   S   L   E   E   I   S   T   I   L   P   V   154

AGC GCC TAT CTC AAT TTA GAA CTA AGA GAT ATA TTT GTA CAC GTT TCG TCC GAG GCT GGT TTA TCT  (528)
 S   A   Y   L   N   L   E   L   R   D   I   F   V   H   V   S   S   E   A   G   L   S   176

TCT TAC AAA GCA GGA TTG GAA GGA TTT TCT CTT GCC TTT GAG TTG GAT ACG GTT CGA TTT CGA AAA  (594)
 S   Y   K   A   G   L   E   G   F   S   L   A   F   E   L   D   T   V   R   F   R   K   198

ATT CCT TTG AAC GTT CGG ATT CTT CAG TTA ATC GAC GTT ATA CGA TTT AAA ATG AAT CCT GAA AAA  (660)
 I   P   L   N   V   R   I   L   Q   L   I   D   V   I   R   F   K   M   N   P   E   K   220

ACG GTT CGA ATC TAT TTC GAA GAT AAT TCT AAG TCG TTA GAT CAA CCG TTT AGA CTT GGA TTG GAA  (726)
 T   V   R   I   Y   F   E   D   N   S   K   S   L   D   Q   P   F   R   L   G   L   E   242

TTG TCT CGG GAT CTA TCG ATT CCA GGA GGA GTG TTC CTA TCC CAA GCA GAT ATA GGC GCG GAT TCA  (792)
 L   S   R   D   L   S   I   P   G   G   V   F   L   S   Q   A   D   I   G   A   D   S   264

ATT CCT ATA AAA GTA CAA AAT AAA TTA CTC GCT CCT TTT GGT TTT GGT CTC AGA TAT AAA CTC GGT  (858)
 I   P   I   K   V   Q   N   K   L   L   A   P   F   G   F   G   L   R   Y   K   L   G   286

TAT TTG GAA AAA GAA GAT AAA CTC AAA CTA GAA AAC TTA GAA TTA AAA GTA AAC GAA GAC GTT TGG  (924)
 Y   L   E   K   E   D   K   L   K   L   E   N   L   E   L   K   V   N   E   D   V   W   308

TTA TCT GCT GCG GGA GAA ATG GTC GGA GTT TCC TCT AAA GAA AGA AAC GTT CAA TTT GGG ATT CAA  (990)
 L   S   A   A   G   E   M   V   G   V   S   S   K   E   R   N   V   Q   F   G   I   Q   330

AAG TCT TTA ATT CGT TTA AAA CCT CTT TCC GAT TTT TTA TCT ACG ATT CCG GGA ATT CCT AAG ATG (1056)
 K   S   L   I   R   L   K   P   L   S   D   F   L   S   T   I   P   G   I   P   K   M   352

        <          LepA069NR                TCA
AAA TTG GAC GGA GAA TTG AGT CTG GCT CCG ATT ACA ATT TCT GGA AAG GAC ACT CGA TTG AAA GTG (1122)
 K   L   D   G   E   L   S   L   A   P   I   T   I   S   G   K   D   T   R   L   K   V   374

GAA GCA GAT ATT GGA GCA AAG GAT CTT TTG ATT TCT ATC GGT GGA AAA AAT CAT AAA ATT CCT AAG (1188)
 E   A   D   I   G   A   K   D   L   L   I   S   I   G   G   K   N   H   K   I   P   K   396

TTA AAA CTT TTA GCC GAT TTT ATA CTT CAT CCA TTT ACT CAA GAA ACA CCT AAC GCT AGT AAA CCG (1254)
 L   K   L   L   A   D   F   I   L   H   P   F   T   Q   E   T   P   N   A   S   K   P   418

GTT CCT ATA CTT GAA AAT CTT AGA TTA AAA GAA CTG TCA CTT GAC TAT AAT GGG ATT CAA TTA TCA (1320)
 V   P   I   L   E   N   L   R   L   K   E   L   S   L   D   Y   N   G   I   Q   L   S   440

GCG ACC GGA AAC ATA CTA AGA GGT TCC CAG TTA GAT TTG GAT TTT GGG GTT CAA AAT TTA AAT CTC (1386)
 A   T   G   N   I   L   R   G   S   Q   L   D   L   D   F   G   V   Q   N   L   N   L   462

TCG GAT TAT GTA AAG ACC TTA AAC GGA GTT TTG GGT CTA AAA ATG AAG GCT ACA GGA ATA TTC AAT (1452)
 S   D   Y   V   K   T   L   N   G   V   L   G   L   K   M   K   A   T   G   I   F   N   484

TCT TTG AAT GTA GAT GGA GCC GTT CAA CTT TCT GGT TTT CGT TTC CCA ATG GGA AGA GGA AAG TCG (1518)
 S   L   N   V   D   G   A   V   Q   L   S   G   F   R   F   P   M   G   R   G   K   S   506

TCT CCG ATT CCG GTA AAT TTG GAT CTA AAA TCC AGA ATT CAA TTT TCA AAA CCA TTT ATC CCC GAT (1584)
 S   P   I   P   V   N   L   D   L   K   S   R   I   Q   F   S   K   P   F   I   P   D   528

TCG GTT CTT TTA GAT TCT ATT TCG ATT TCT ACC AAA GGT TTG GAA GGA AAG GAA TCT CTT AAA ATT (1650)
 S   V   L   L   D   S   I   S   I   S   T   K   G   L   E   G   K   E   S   L   K   I   550

TCA TCT ATT GGA AAT TTG GGT TTG GGA AAA GGA TTT AGT ATG AAT CTA AAT TCT TTA GTA ATT AAA (1716)
 S   S   I   G   N   L   G   L   G   K   G   F   S   M   N   L   N   S   L   V   I   K   572
```

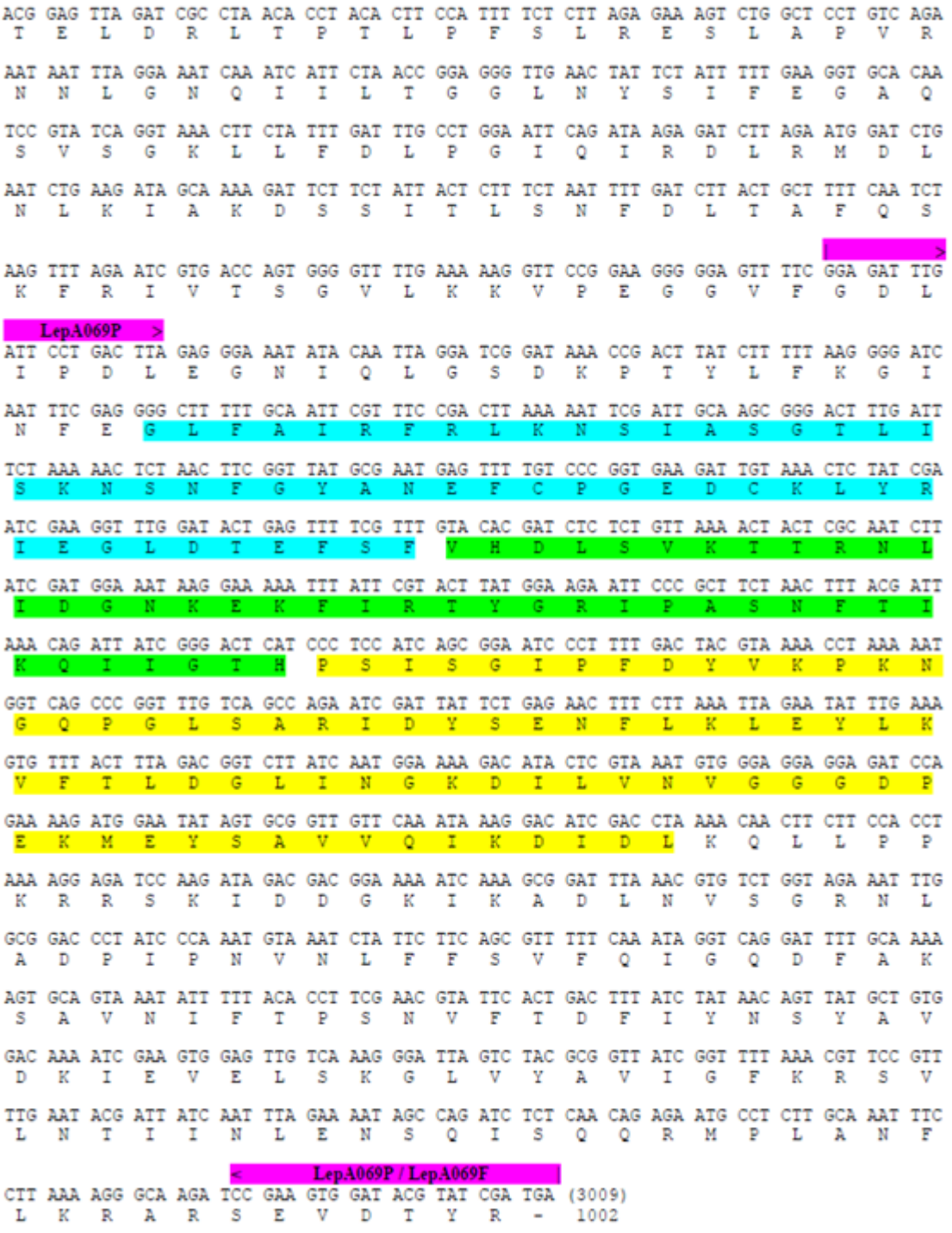
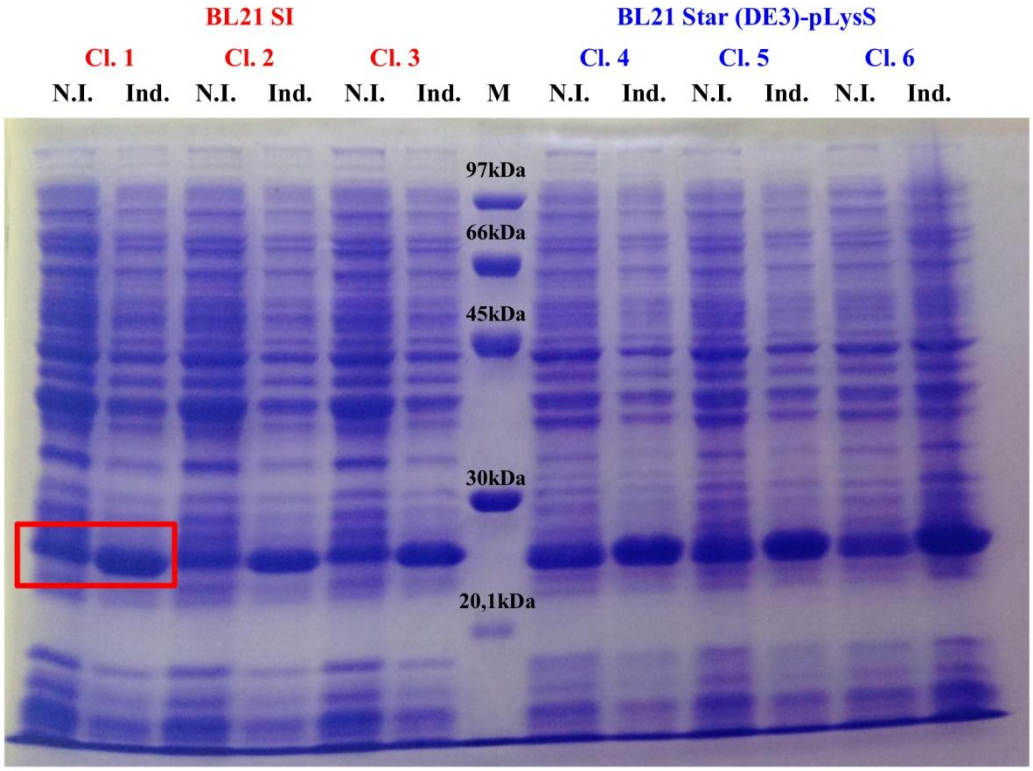
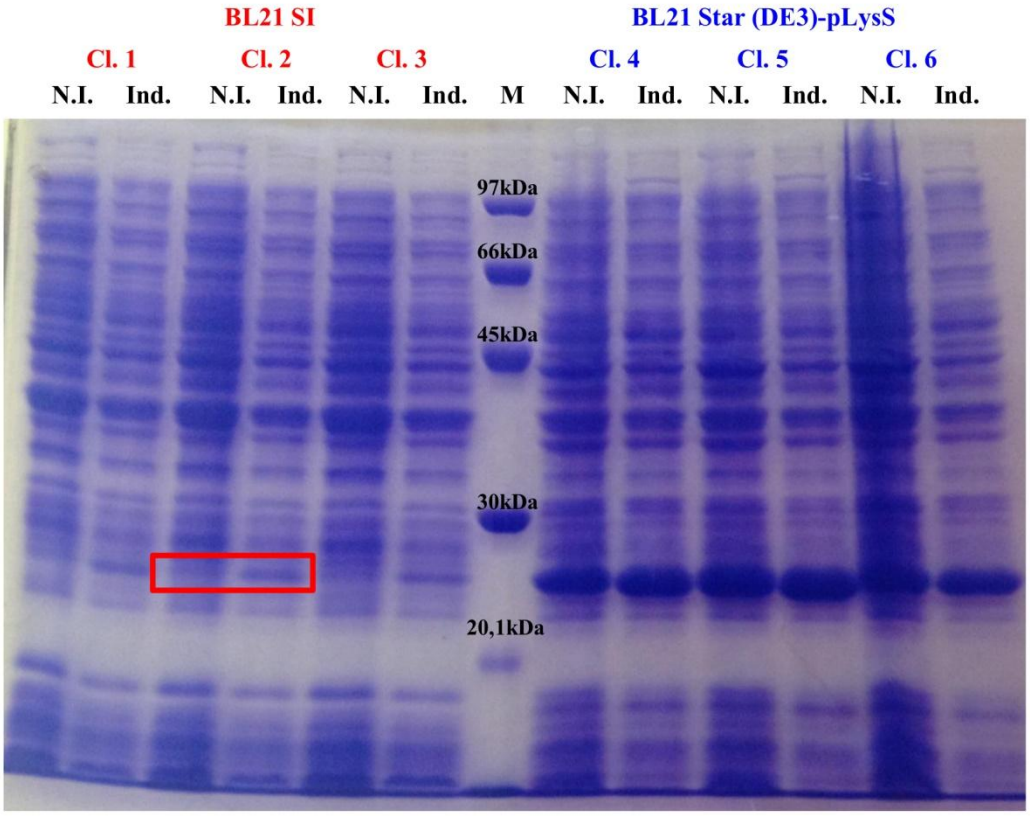


Figura A2. Sequências nucleotídica e peptídica da proteína LepA069. Na figura, estão destacadas as posições da região transmembrana da proteína (*azul*), do domínio *AsmA_2* (*cinza*), das sequências apresentadas pelos fagos 1.2 (*azul claro*) e 3.21 (*amarelo*, com sobreposição em *verde*) e dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação das sequências selecionadas para clonagem (LepA069F e LepA069NR em *verde*, LepA069P e LepA069F em *rosa*).

A. LepA388P



B. LepA388NR



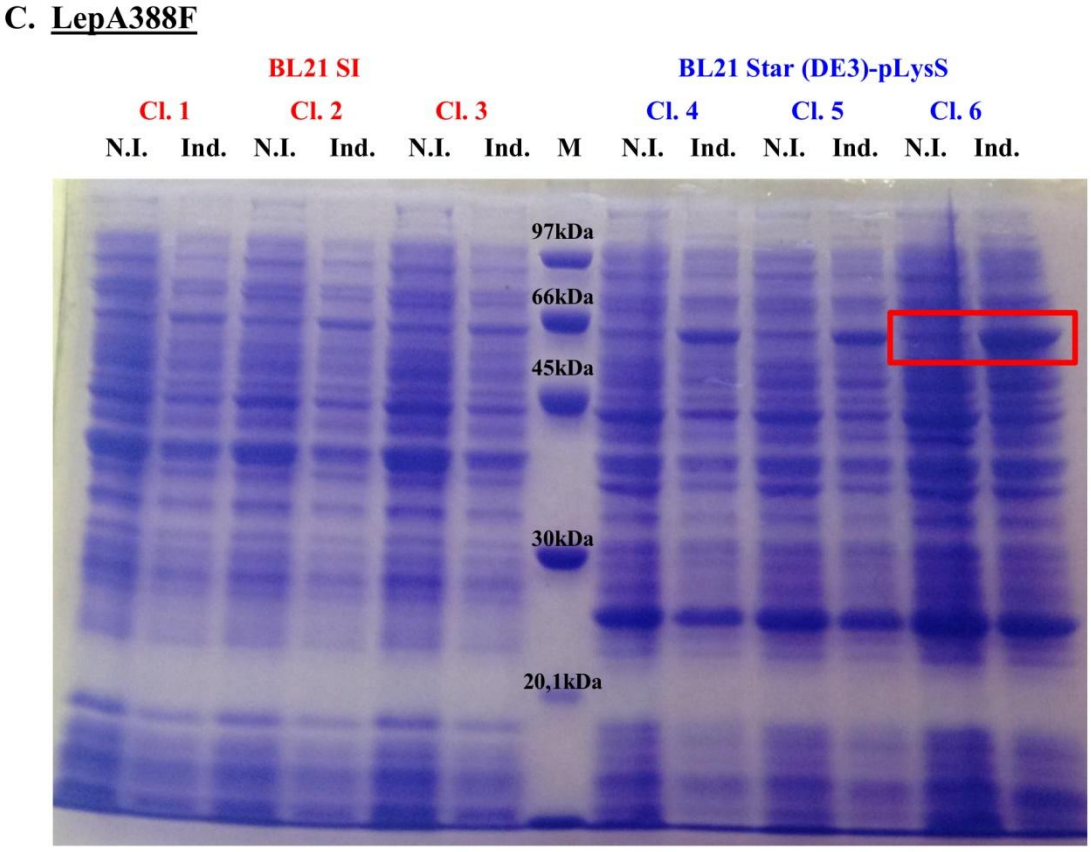


Figura A3. Análise da expressão das proteínas LepA388P, LepA388NR e LepA388F em bactérias *E. coli* BL21 SI e BL21 Star (DE3)-pLysS. SDS-PAGE comparando culturas não induzidas (*N.I.*) e induzidas (*Ind.*) nas duas cepas bacterianas para cada proteína. Em cada bactéria, foram analisados três clones diferentes (*Cl. 1-3* em BL21 SI e *Cl. 4-6* em BL21 Star (DE3)-pLysS). As proteínas expressas em BL21 SI foram induzidas com 300 mM de NaCl, enquanto que as proteínas expressas em BL21 Star (DE3)-pLysS foram induzidas com 1,2 mM IPTG. Os clones selecionados de cada proteína para expressões posteriores estão destacados (LepA388P e LepA388NR = ~25 kDa; LepA388F = ~65 kDa). Os géis contêm 12% de poliacrilamida e foram corados com azul de Coomassie. **M-** Marcador *Amersham Low Molecular Weight* (GE Healthcare Life Sciences®).

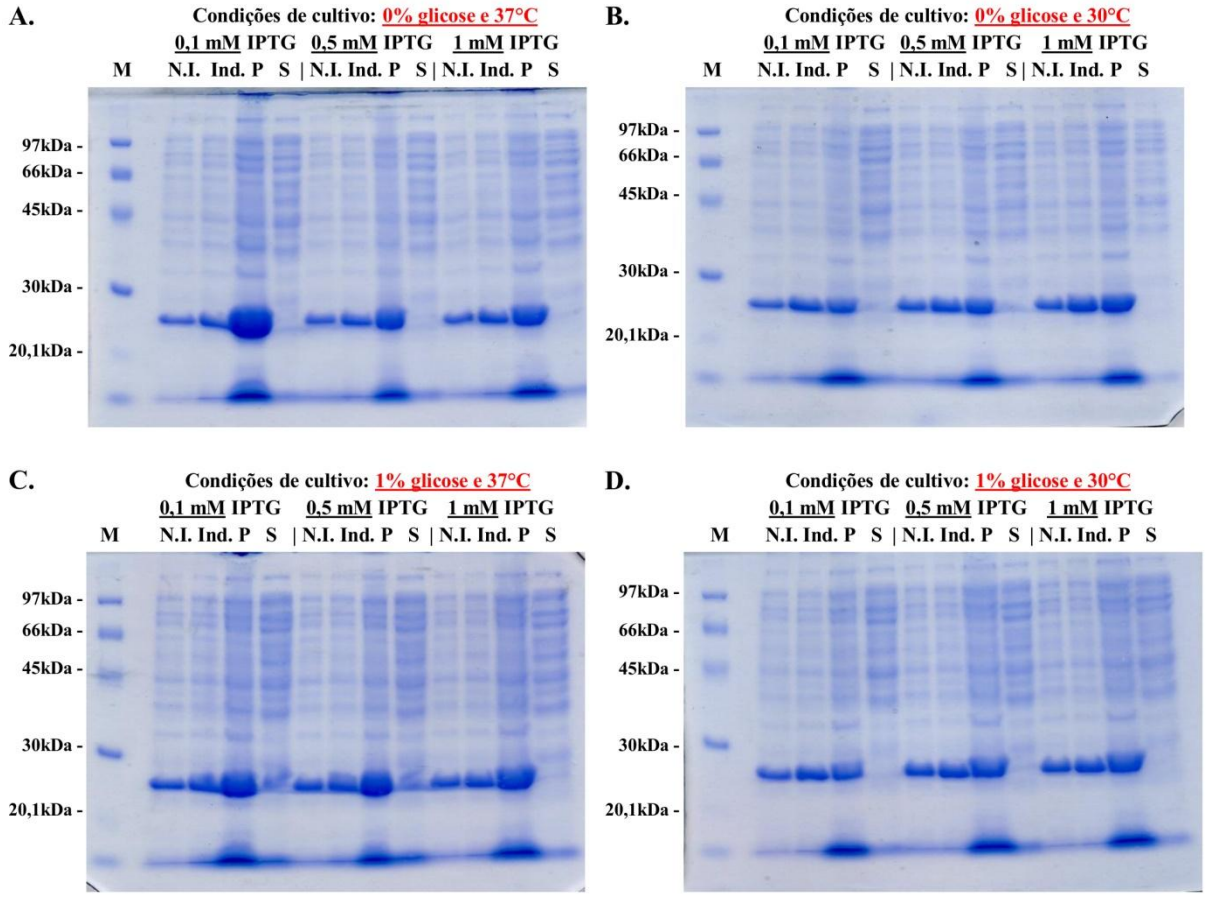
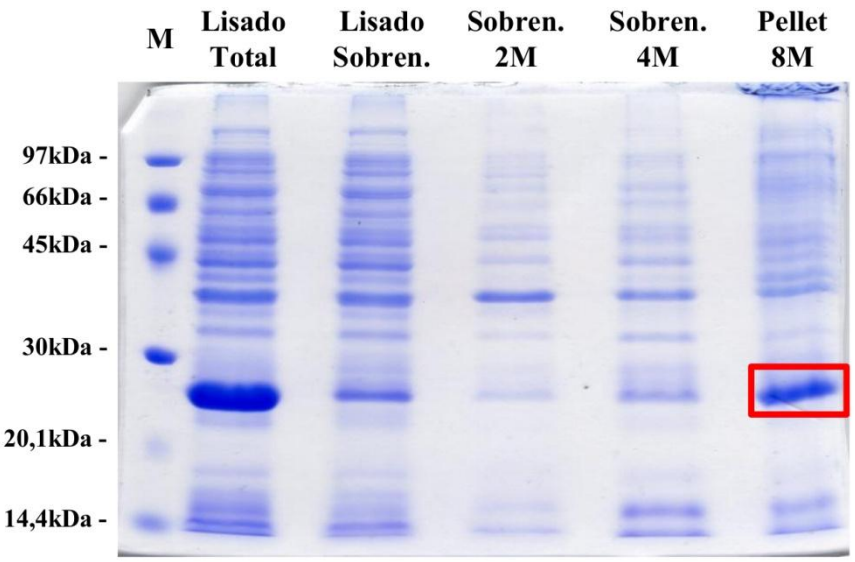
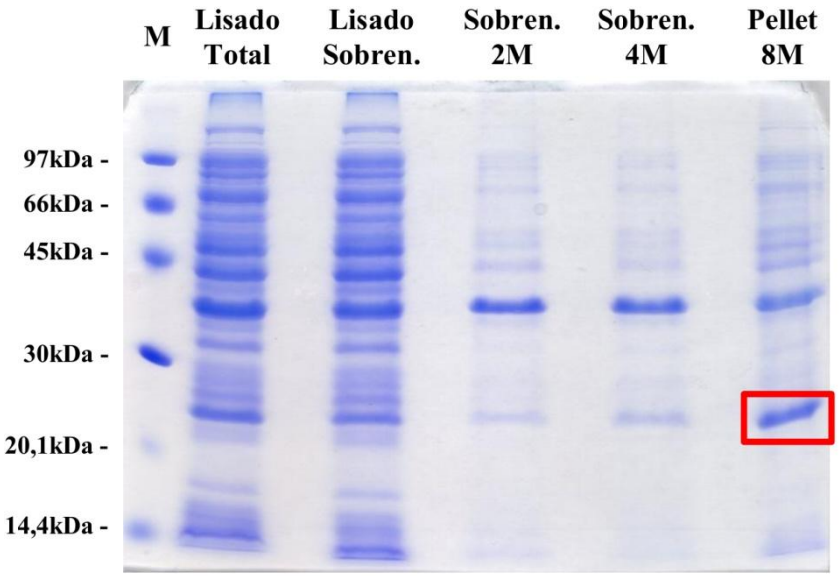


Figura A4. Teste da expressão da proteína LepA388P em bactérias *E. coli* Origami em diferentes condições de cultivo e expressão. SDS-PAGE comparando culturas não induzidas (*N.I.*) e induzidas (*Ind.*), e as proteínas insolúveis (*P* = pellet) e solúveis (*S* = sobrenadante) obtidas a partir da lise e centrifugação das mesmas culturas. As figuras **A-B** e **C-D** apresentam os resultados do cultivo das bactérias e expressão das proteínas em *0% de glicose* e *1% de glicose*, respectivamente. As figuras **A-C** e **B-D** apresentam os resultados da expressão das proteínas a *37°C* e *30°C*, respectivamente. Em todas as condições de cultivo e expressão, foram testadas três quantidades diferentes do indutor IPTG (*0,1 mM*, *0,5 mM* ou *1 mM*). A banda correspondente à proteína LepA388P possui ~25 kDa. Os géis contêm 12% de poliacrilamida e foram corados com azul de Coomassie. **M-** Marcador *Amersham Low Molecular Weight* (GE Healthcare Life Sciences®).

A. LepA388P



B. LepA388NR



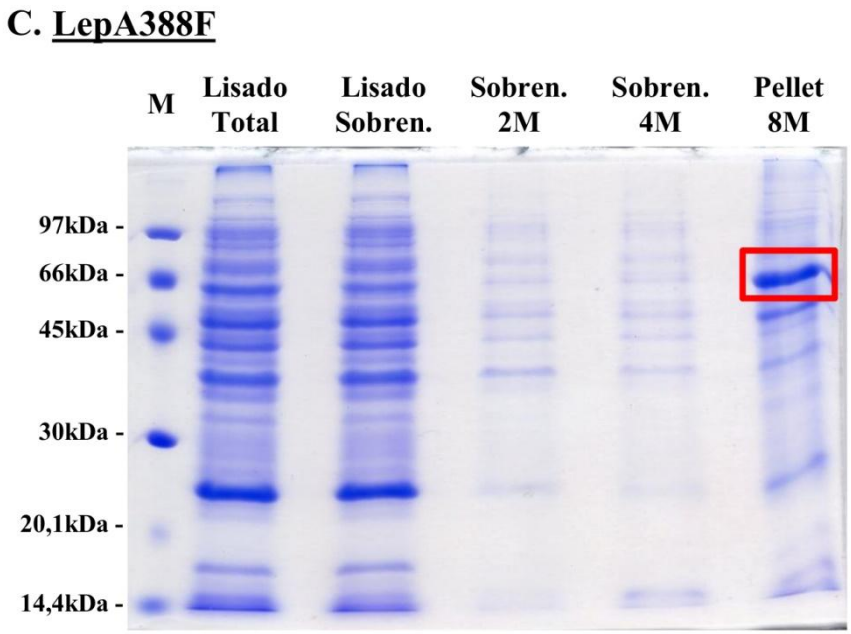
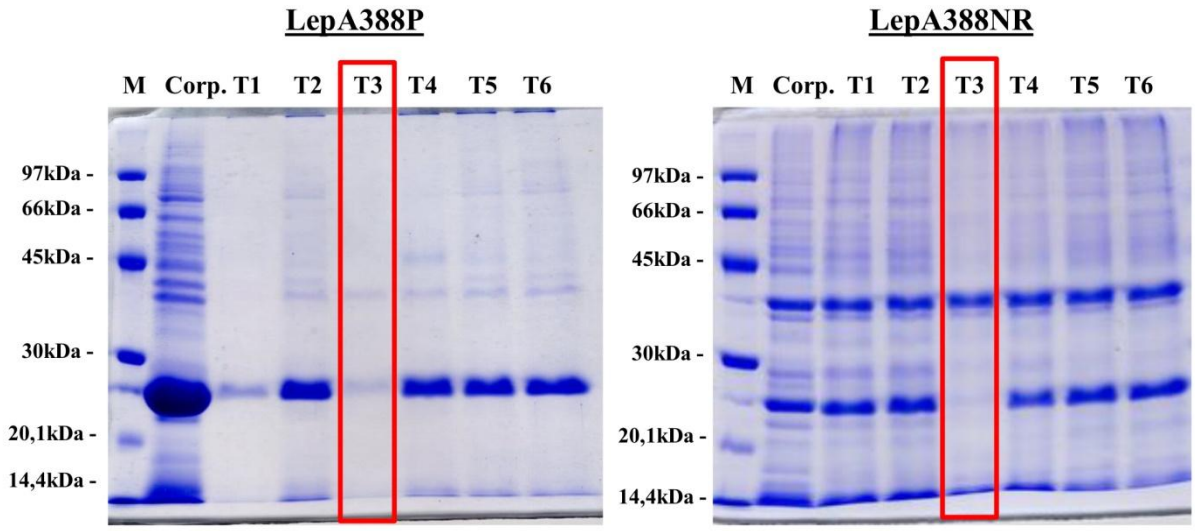


Figura A5. Solubilização das proteínas LepA388P, LepA388NR e LepA388F, após expressão em bactérias *E. coli*. SDS-PAGE comparando a cultura lisada (*Lisado Total*), o sobrenadante da cultura lisada após centrifugação (*Lisado Sobren.*), as sucessivas lavagens dos pellets resultantes em tampões com 2 M de ureia (*Sobren. 2M*) e 4 M de ureia (*Sobren. 4M*), e a ressuspensão final dos pellets em tampão 8 M de ureia (*Pellet 8M*). As bandas correspondentes às proteínas estão destacadas nas amostras *Pellet 8M* (LepA388P e LepA388NR = ~25 kDa; LepA388F = ~65 kDa). Os géis contêm 12% de poliacrilamida e foram corados com azul de Coomassie. **M-** Marcador *Amersham Low Molecular Weight* (GE Healthcare Life Sciences®).



Tratamentos

T1	50mM Tris-EDTA pH 8
T2	**T1** + 5 mM GSH/GSSG 1:1
T3	**T1** + 500 mM Arg pH 11
T4	**T3** + 5 mM GSH/GSSG 1:1
T5	**T1** + 1 M Gdn-HCl
T6	**T5** + 5 mM GSH/GSSG 1:1

Figura A6. Renaturação de proteínas por altas pressões hidrostáticas. SDS-PAGE de amostras de corpúsculos de inclusão lavados (*Corp.*) para as proteínas LepA388P e LepA388NR. Na figura, estão representadas as proteínas precipitadas após renaturação com um dos seis tratamentos (*T1-T6*, resumidos na tabela) e diálise, confirmando o tratamento mais eficiente para a solubilização das proteínas (em destaque). LepA388P e LepA388NR = ~25 kDa. Os géis contêm 12% de poliacrilamida e foram corados com azul de Coomassie. **M-** Marcador *Amersham Low Molecular Weight* (GE Healthcare Life Sciences®).

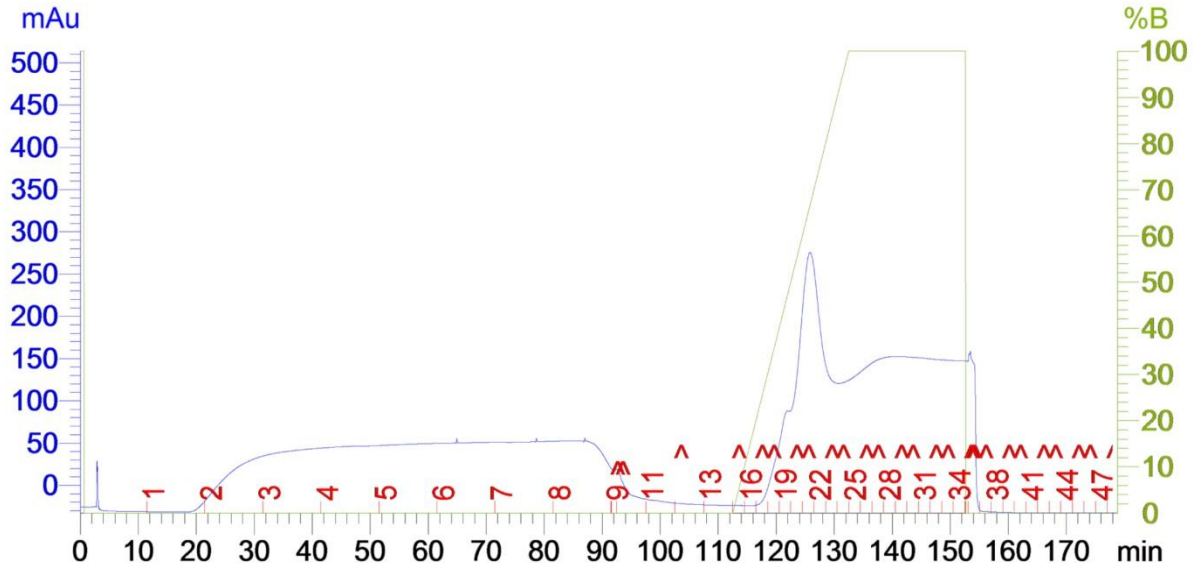


Figura A7. Análise da purificação da proteína LepA388P através do ÄKTAprime plus (GE Healthcare Life Sciences®). Gráfico apresentando a absorbância de luz UV a 280 nm, medida por mAu (*milli Absorbance unit*; em *azul*), e a proporção do tampão de eluição com 500 mM de imidazol *(%B*, em *verde*) durante o processo de purificação. A primeira elevação da curva de absorbância ocorreu durante o carregamento da coluna com a proteína, enquanto que o pico da absorbância a partir das amostras 18 e 19 representa o início da eluição, coincidindo com o aumento na concentração do tampão de eluição.

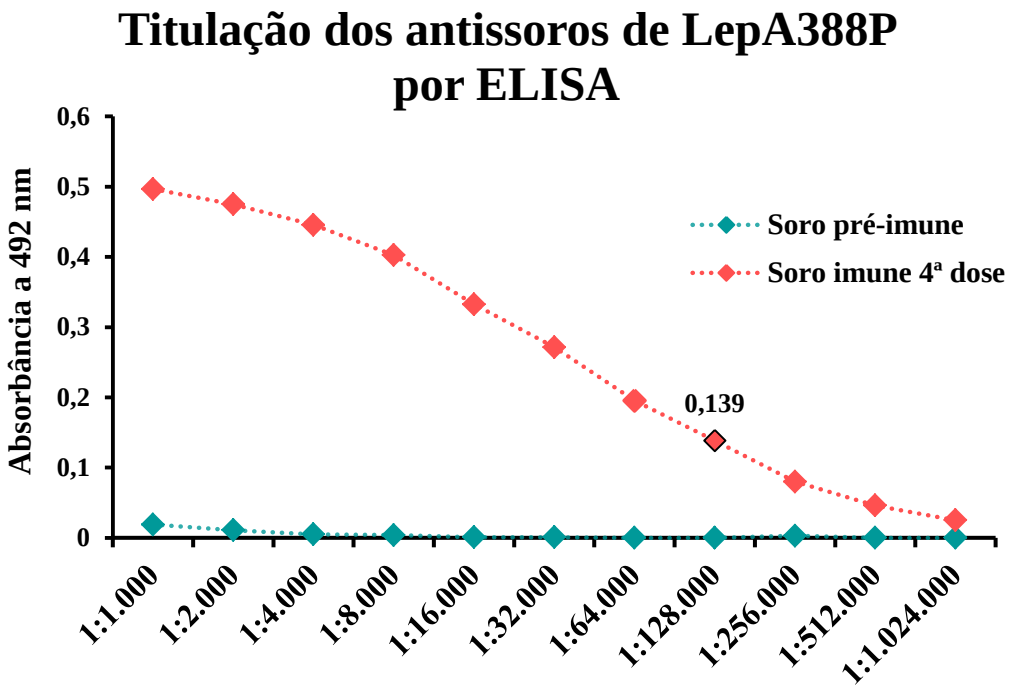


Figura A8. Titulação por ELISA de antissoros obtidos após imunização de camundongos com a proteína LepA388P purificada. As sangrias para a obtenção dos antissoros foram realizadas antes da 1ª dose (*Soro pré-imune*) e depois da 4ª dose (*Soro imune 4ª dose*). Os valores plotados correspondem à absorbância a 492 nm resultante para cada diluição, subtraindo a absorbância obtida pelo controle negativo (sem adição de antissoros). O ponto destacado na curva apresentada pelas diluições do antissoro imune representa o título determinado para o antissoro, pois sua absorbância resultante é a mais próxima de 0,1.

8. REFERÊNCIAS

ADLER, B. Vaccines Against Leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 387, p. 251–272, 2015.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, v. 140, n. 3-4, p. 287–296, 2010.

ADLER, B.; LO, M.; SEEMANN, T.; MURRAY, G. L. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. *Veterinary Microbiology*, v. 153, n. 1-2, p. 73–81, 2011.

AKHTER, Y.; EHEBAUER, M. T.; MUKHOPADHYAY, S.; HASNAIN, S. E. The PE/PPE multigene family codes for virulence factors and is a possible source of mycobacterial antigenic variation: Perhaps more? *Biochimie*, v. 94, n. 1, p. 110–116, 2012.

ATZINGEN, M. V; BARBOSA, A. S.; DE BRITO, T.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; LIMA, D. M.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC microbiology*, v. 8, p. 70, 2008.

ATZINGEN, M. V.; GÓMEZ, R. M.; SCHATTNER, M.; PRETRE, G.; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. *Journal of Infection*, v. 59, n. 4, p. 264–276, 2009.

ATZINGEN, M. V.; RODRIGUEZ, D.; SIQUEIRA, G. H.; LEITE, L. C. C.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Induction of Boosted Immune Response in Mice by Leptospiral Surface Proteins Expressed in Fusion with DnaK. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–11, 2014.

BARBAS, C. F.; BURTON, D. N.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. *Phage display: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 736 p

BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A. E.; NEVES, F. O.; ATZINGEN, M. V.; WATANABE, M. M.; VIEIRA, M. L.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infection and Immunity*, v. 74, n. 11, p. 6356–6364, 2006.

BECKMANN, C.; WAGGONER, J. D.; HARRIS, T. O.; TAMURA, G. S.; RUBENS, C. E. Identification of novel adhesins from group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 6, p. 2869–2876, 2002.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, 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*, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003.

BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 39, p. 14560–14565, 2006.

CAMARGO, A. A.; SAMAIA, H. P.; DIAS-NETO, E.; SIMÃO, D. F.; MIGOTTO, I. A.; BRIONES, M. R.; COSTA, F. F.; NAGAI, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; ZAGO, M. A.; ANDRADE, L. E.; CARRER, H.; EL-DORRY, H. F.; ESPREAFICO, E. M.; HABR-GAMA, A.; GIANNELLA-NETO, D.; GOLDMAN, G. H.; GRUBER, A.; HACKEL, C.; KIMURA, E. T.; MACIEL, R. M.; MARIE, S. K.; MARTINS, E. A.; NOBREGA, M. P.; PACO-LARSON, M. L.; PARDINI, M. I.; PEREIRA, G. G.;

PESQUERO, J. B.; RODRIGUES, V.; ROGATTO, S. R.; DA SILVA, I. D.; SOGAYAR, M. C.; SONATI, M. F.; TAJARA, E. H.; VALENTINI, S. R.; ALBERTO, F. L.; AMARAL, M. E.; ANEAS, I.; ARNALDI, L. A.; DE ASSIS, A. M.; BENGTSON, M. H.; BERGAMO, N. A.; BOMBONATO, V.; DE CAMARGO, M. E.; CANEVARI, R. A.; CARRARO, D. M.; CERUTTI, J. M.; CORREA, M. L.; CORREA, R. F.; COSTA, M. C.; CURCIO, C.; HOKAMA, P. O.; FERREIRA, A. J.; FURUZAWA, G. K.; GUSHIKEN, T.; HO, P. L.; KIMURA, E.; KRIEGER, J. E.; LEITE, L. C.; MAJUMDER, P.; MARINS, M.; MARQUES, E. R.; MELO, A. S.; MELO, M. B.; MESTRINER, C. A.; MIRACCA, E. C.; MIRANDA, D. C.; NASCIMENTO, A. L.; NOBREGA, F. G.; OJOPI, E. P.; PANDOLFI, J. R.; PESSOA, L. G.; PREVEDEL, A. C.; RAHAL, P.; RAINHO, C. A.; REIS, E. M.; RIBEIRO, M. L.; DA ROS, N.; DE SA, R. G.; SALES, M. M.; SANT'ANNA, S. C.; DOS SANTOS, M. L.; DA SILVA, A. M.; DA SILVA, N. P.; SILVA, W. A.; DA SILVEIRA, R. A.; SOUSA, J. F.; STECCONI, D.; TSUKUMO, F.; VALENTE, V.; SOARES, F.; MOREIRA, E. S.; NUNES, D. N.; CORREA, R. G.; ZALCBERG, H.; CARVALHO, A. F.; REIS, L. F.; BRENTANI, R. R.; SIMPSON, A. J.; DE SOUZA, S. J. The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 21, p. 12103–12108, 2001.

CAMERON, C. E. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 387, p. 21–41, 2015.

CÁRCAMO, J.; RAVERA, M. W.; BRISSETTE, R.; DEDOVA, O.; BEASLEY, J. R.; ALAM-MOGHÉ, A.; WAN, C.; BLUME, A.; MANDECKI, W. Unexpected frameshifts from gene to expressed protein in a phage-displayed peptide library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 19, p. 11146–11151, 1998.

CARVALHO, E.; BARBOSA, A. S.; GÓMEZ, R. M.; CIANCIARULLO, A. M.; HAUK, P.; ABREU, P. A.; FIORINI, L. C.; OLIVEIRA, M. L. S.; ROMERO, E. C.; GONÇALES, A. P.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HO, P. L. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. *FEBS Letters*, v. 583, n. 8, p. 1381–1385, 2009.

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

CHAEMCHUEN, S.; RUNGPRAGAYPHAN, S.; POOVORAWAN, Y.; PATARAKUL, K. Identification of candidate host proteins that interact with LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*, by random phage display peptide library. *Veterinary Microbiology*, v. 153, n. 1-2, p. 178–185, 2011.

CHAKRABARTI, R.; SCHUTT, C. E. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Gene*, v. 274, n. 1-2, p. 293–298, 2001.

CHEN, B.-Y.; JANES, H. W. *PCR cloning protocols*. 2nd. ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2002. 460 p

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

CHOU, L. F.; CHEN, Y. T.; LU, C. W.; KO, Y. C.; TANG, C. Y.; PAN, M. J.; TIAN, Y. C.; CHIU, C. H.; HUNG, C. C.; YANG, C. W. Sequence of *Leptospira santarosai* serovar

Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. *Gene*, v. 511, n. 2, p. 364–370, 2012.

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

CLACKSON, T.; LOWMAN, H. B. *Phage display: a pratical approach*. New York: Oxford University Press, 2004. 356 p

DE GROOT, P. W. J.; BADER, O.; DE BOER, A. D.; WEIG, M.; CHAUHAN, N. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryotic cell*, v. 12, n. 4, p. 470–81, 2013.

DE PABLOS, L. M.; OSUNA, A. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infection and immunity*, v. 80, n. 7, p. 2258–64, 2012.

DIAS-NETO, E.; CORREA, R. G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; BRIONES, M. R.; NAGAI, M. A.; DA SILVA, W.; ZAGO, M. A.; BORDIN, S.; COSTA, F. F.; GOLDMAN, G. H.; CARVALHO, A. F.; MATSUKUMA, A.; BAIA, G. S.; SIMPSON, D. H.; BRUNSTEIN, A.; DE OLIVEIRA, P. S.; BUCHER, P.; JONGENEEL, C. V; O'HARE, M. J.; SOARES, F.; BRENTANI, R. R.; REIS, L. F.; DE SOUZA, S. J.; SIMPSON, A. J. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 7, p. 3491–3496, 2000.

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

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

EVANGELISTA, K. V.; HAHN, B.; WUNDER, E. A.; KO, A. I.; HAAKE, D. A.; COBURN, J. Identification of Cell-Binding Adhesins of *Leptospira interrogans*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 10, p. e3215, 2014.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd. ed. Melbourne: MediSci, 1999. 296 p

FEHRSEN, J.; DU PLESSIS, D. H. Cross-reactive epitope mimics in a fragmented-genome phage display library derived from the rickettsia, *Cowdria ruminantium*. *Immunotechnology*, v. 4, n. 3-4, p. 175–184, 1999.

FERNANDES, L. G. V; VIEIRA, M. L.; KIRCHGATTER, K.; ALVES, I. J.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Ompl1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. *Infection and Immunity*, v. 80, n. 10, p. 3679–3692, 2012.

FERRER-MIRALLES, N.; SACCARDO, P.; CORCHERO, J. L.; XU, Z.; GARCÍA-FRUITÓS, E. General Introduction: Recombinant Protein Production and Purification of Insoluble Proteins. In: GARCÍA-FRUITÓS, E. (Ed.). *Insoluble Proteins: Methods and Protocols*. New York: Springer, 2014. p. 1–24.

FITZGERALD-HAYES, M.; REICHSMAN, F. *DNA and biotechnology*. San Diego: Academic Press, 2009. 400 p

FOURNIER, P. E.; TAYLOR, C.; ROLAIN, J. M.; BARRASSI, L.; SMITH, G.; RAOULT, D. *Bartonella australis* sp. nov. from Kangaroos, Australia. *Emerging Infectious Diseases*, v. 13, n. 12, p. 1961–1963, 2007.

FRAGA, T. R.; CHURA-CHAMBI, R. M.; GONÇALES, A. P.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; MORGANTI, L.; MARTINS, E. A. L. Refolding of the recombinant protein OmpA70 from *Leptospira interrogans* from inclusion bodies using high hydrostatic pressure and partial characterization of its immunological properties. *Journal of Biotechnology*, v. 148, n. 2-3, p. 156–162, 2010.

FRYER, J. L.; HEDRICK, R. P. *Piscirickettsia salmonis*: A Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *Journal of Fish Diseases*, v. 26, n. 5, p. 251–262, 2003.

GIORDANO, R. J.; CARDÓ-VILA, M.; LAHDENRANTA, J.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nature medicine*, v. 7, n. 11, p. 1249–1253, 2001.

GUPTILL, L. Bartonellosis. *Veterinary Microbiology*, v. 140, n. 3-4, p. 347–359, 2010.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in Humans. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 387, p. 65–97, 2015.

HAUK, P.; MACEDO, F.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; BARBOSA, A. S.; HO, P. L. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infection and immunity*, v. 76, n. 6, p. 2642–50, 2008.

HAUK, P.; NEGROTTO, S.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; GENOVEZ, M. É.; WARD, R. J.; SCHATTNER, M.; GOMÉZ, 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*, v. 333, n. 4, p. 1341–1347, 2005.

HO, J. G. S.; MIDDELBERG, A. P. J.; RAMAGE, P.; KOCHER, H. P. The likelihood of aggregation during protein renaturation can be assessed using the second virial coefficient. *Protein Science*, v. 12, n. 4, p. 708–716, 2003.

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

IDO, Y.; HOKI, R.; ITO, H.; WANI, H. The Prophylaxis Of Weil's Disease (SPIROCHÆTOSIS ICTEROHÆMORRHAGICA). *The Journal of experimental medicine*, v. 24, n. 5, p. 471–483, 1916.

JACOBSSON, K.; FRYKBERG, L. Cloning of ligand-binding domains of bacterial receptors by phage display. *BioTechniques*, v. 18, n. 5, p. 878–882+884, 1995.

JACOBSSON, K.; ROSANDER, A.; BJERKETORP, J.; FRYKBERG, L. Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptins or other Exported Proteins. *Biological procedures online*, v. 5, n. 1, p. 123–135, 2003.

KAAKOUSH, N. O.; CASTAÑO-RODRÍGUEZ, N.; MITCHELL, H. M.; MAN, S. M. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, n. 3, p. 687–720, 2015.

KAISER, P. O.; RIESS, T.; O'ROURKE, F.; LINKE, D.; KEMPF, V. A. J. *Bartonella* spp.: Throwing light on uncommon human infections. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 301, n. 1, p. 7–15, 2011.

KERSULYTE, D.; ROSSI, M.; BERG, D. E. Sequence divergence and conservation in genomes of *Helicobacter cetorum* strains from a dolphin and a whale. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, 2013.

KLINE, K. A.; FÄLKER, S.; DAHLBERG, S.; NORMARK, S.; HENRIQUES-NORMARK, B. Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host and Microbe*, v. 5, n. 6, p. 580–592, 2009.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature reviews. Microbiology*, v. 7, n. 10, p. 736–747, 2009.

LANGLEY, R. R.; RAMIREZ, K. M.; TSAN, R. Z.; ARSDALL, M. Van; NILSSON, M. B.; FIDLER, I. J. Tissue-specific Microvascular Endothelial Cell Lines from H-2K b - tsA58 Mice for Studies of Angiogenesis and Metastasis. *Cancer Research*, v. 63, p. 2971–2976, 2003.

LEE, S.; CARPENTER, J. F.; CHANG, B. S.; RANDOLPH, T. W.; KIM, Y. Effects of solutes on solubilization and refolding of proteins from inclusion bodies with high hydrostatic pressure. *Protein Science*, v. 15, p. 304–313, 2006.

LEHMANN, J.; MATTHIAS, M.; VINETZ, J.; FOUTS, D. Leptospiral Pathogenomics. *Pathogens*, v. 3, n. 2, p. 280–308, 2014.

LEHMANN, J. S.; FOUTS, D. E.; HAFT, D. H.; CANNELLA, A. P.; RICALDI, J. N.; BRINKAC, L.; HARKINS, D.; DURKIN, S.; SANKA, R.; SUTTON, G.; MORENO, A.; VINETZ, J. M.; MATTHIAS, M. A. Pathogenomic Inference of Virulence-Associated Genes in *Leptospira interrogans*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2013.

LEMKE, L. S.; CHURA-CHAMBI, R. M.; RODRIGUES, D.; CUSSIOL, J. R. R.; MALAVASI, N. V.; ALEGRIA, T. G. P.; NETTO, L. E. S.; MORGANTI, L.; SIMONI, L.; CHURA-CHAMBI, R. M.; RODRIGUES, D.; RENATO, J.; CUSSIOL, R.; VALLEJO, N.; GERONIMO, T.; ALEGRIA, P.; EDUARDO, L.; NETTO, S.; MORGANTI, L. Investigation on solubilization protocols in the refolding of the thioredoxin TsnC from *Xylella fastidiosa* by high hydrostatic pressure approach. *Protein Expression and Purification*, v. 106, p. 72–77, 2015.

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

LEVETT, P. N. Systematics of Leptospiraceae. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 387, p. 11–20, 2015.

LIMA, S. S.; CHING, A. T. C.; FÁVARO, R. D.; DA SILVA, J. B.; OLIVEIRA, M. L. S.; CARVALHO, E.; ABREU, P. A. E.; VASCONCELLOS, S. A.; HO, P. L. Adhesin activity of *Leptospira interrogans* lipoprotein identified by in vivo and in vitro shotgun phage display. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 431, n. 2, p. 342–347, 2013.

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

LONGHI, M. T.; OLIVEIRA, T. R.; ROMERO, E. C.; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. *Journal of Medical Microbiology*, v. 58, n. 10, p. 1275–1282, 2009.

MALAVASI, N. V.; FOGUEL, D.; BONAFE, C. F. S.; BRAGA, C. A. C. A.; CHURA-CHAMBI, R. M.; VIEIRA, J. M.; MORGANTI, L. Protein refolding at high pressure: Optimization using eGFP as a model. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 2, p. 512–518, 2011.

MARCSISIN, R. A.; BARTPHO, T.; BULACH, D. M.; SRIKRAM, A.; SERMSWAN, R. W.; ADLER, B.; MURRAY, G. L. Use of a high-throughput screen to identify *Leptospira* mutants unable to colonize the carrier host or cause disease in the acute model of infection. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, n. 10, p. 1601–1608, 2013.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; KO, A. I.

Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. v. 49, p. 929–945, 2003.

MATSUNAGA, J.; LO, M.; BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; ADLER, B.; HAAKE, D. A. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: Relevance in signaling the environment-to-host transition. *Infection and Immunity*, v. 75, n. 6, p. 2864–2874, 2007.

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

MATSUNAGA, J.; SCHLAX, P. J.; HAAKE, D. A. Role for cis-Acting RNA sequences in the temperature-dependent expression of the multiadhesive lig proteins in *Leptospira interrogans*. *Journal of Bacteriology*, v. 195, n. 22, p. 5092–5101, 2013.

MÉNARD, A.; PÉRÉ-VÉDRENNE, C.; HAESEBROUCK, F.; FLAHOU, B. Gastric and Enterohepatic Helicobacters other than *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, v. 19, p. 59–67, 2014.

MENDES, R. S.; VON ATZINGEN, M.; DE MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; SERRANO, S. M. T.; ASEGA, A. F.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. The novel leptospiral surface adhesin Lsa20 binds laminin and human plasminogen and is probably expressed during infection. *Infection and Immunity*, v. 79, n. 11, p. 4657–4667, 2011.

MERINO, S.; TOMÁS, J. M. Bacterial Capsules and Evasion of Immune Responses. In: *Encyclopedia of life sciences*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd, 2010. p. 1–7.

MULLEN, L. M.; NAIR, S. P.; WARD, J. M.; RYCROFT, A. N.; HENDERSON, B. Phage display in the study of infectious diseases. *Trends in Microbiology*, v. 14, n. 3, p. 141–147, 2006.

MULLEN, L. M.; NAIR, S. P.; WARD, J. M.; RYCROFT, A. N.; WILLIAMS, R. J.; HENDERSON, B. Comparative functional genomic analysis of Pasteurellaceae adhesins using phage display. *Veterinary Microbiology*, v. 122, n. 1-2, p. 123–134, 2007.

MUÑOZ-PROVENCIO, D.; MONEDERO, V. Shotgun phage display of *Lactobacillus casei* BL23 against collagen and fibronectin. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, n. 2, p. 197–203, 2011.

MURRAY, G. L.; MOREL, V.; CERQUEIRA, G. M.; CRODA, J.; SRIKRAM, A.; HENRY, R.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; BULAEH, D. M.; SERMSWAN, R. W.; ADLER, B.; PICARDEAU, M. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 2, p. 810–816, 2009a.

MURRAY, G. L.; SRIKRAM, A.; HOKE, D. E.; WUNDER, E. A.; HENRY, R.; LO, M.; ZHANG, K.; SERMSWAN, R. W.; KO, A. I.; ADLER, B. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 3, p. 952–958, 2009b.

MUSSO, D.; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 46, n. 4, p. 245–252, 2013.

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, S.; FERRO, M. I. T.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GÓES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S.; HARAKAVA, R.; JERÔNIMO, 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.; OLIVEIRA, R. C. De; 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.; SLUYS, M. A. Van. Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. *Journal of bacteriology*, v. 186, n. 7, p. 2164–2172, 2004.

NIEMANN, H. H.; SCHUBERT, W. D.; HEINZ, D. W. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: A structural view. *Microbes and Infection*, v. 6, n. 1, p. 101–112, 2004.

NILSSON, M.; FRYKBERG, L.; FLOCK, J. I.; PEI, L.; LINDBERG, M.; GUSS, B. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and immunity*, v. 66, n. 6, p. 2666–2673, 1998.

NUNES, F. M. F.; VALENTE, V.; SOUSA, J. F.; CUNHA, M. A. V; PINHEIRO, D. G.; MAIA, R. M.; ARAUJO, D. D.; COSTA, M. C. R.; MARTINS, W. K.; CARVALHO, A. F.; MONESI, N.; NASCIMENTO, A. M.; PEIXOTO, P. M. V; SILVA, M. F. R.; RAMOS, R. G. P.; REIS, L. F. L.; DIAS-NETO, E.; SOUZA, S. J.; SIMPSON, A. J. G.; ZAGO, M. A.; SOARES, A. E. E.; BITONDI, M. M. G.; ESPREAFICO, E. M.; ESPINDOLA, F. S.; PACO-LARSON, M. L.; SIMOES, Z. L. P.; HARTFELDER, K.; SILVA, W. A. The use of Open Reading frame ESTs (ORESTES) for analysis of the honey bee transcriptome. *BMC genomics*, v. 5, p. 84, 2004.

O'ROURKE, J. L.; GREHAN, M.; LEE, A. Non-*pylori Helicobacter* species in humans. *Gut*, v. 49, n. 5, p. 601–606, 2001.

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

OLIVEIRA, T. R.; LONGHI, M. T.; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. *Microbes and Infection*, v. 12, n. 3, p. 207–217, 2010.

PICARDEAU, M. Conjugative transfer between *Escherichia coli* and *Leptospira* spp. as a new genetic tool. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 1, p. 319–322, 2008.

PICARDEAU, M. Genomics, Proteomics, and Genetics of *Leptospira*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 387, p. 43–63, 2015.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE*, v. 3, n. 2, p. 1–9, 2008.

PINNE, M.; CHOY, H. A.; HAAKE, D. A. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 4, n. 9, p. e815, 2010.

PINNE, M.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Leptospiral Outer Membrane Protein Microarray, a Novel Approach: To Identification of Host Ligand-Binding Proteins. *Journal of Bacteriology*, v. 194, n. 22, p. 6074–6087, 2012.

PIZARRO-CERDÁ, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, v. 124, n. 4, p. 715–727, 2006.

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

REN, S.-X.; FU, G.; 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*, v. 422, n. 6934, p. 888–893, 2003.

RICALDI, J. N.; FOUTS, D. E.; SELENGUT, J. D.; HARKINS, D. M.; PATRA, K. P.; MORENO, A.; LEHMANN, J. S.; PURUSHE, J.; SANKA, R.; TORRES, M.; WEBSTER, N. J.; VINETZ, J. M.; MATTHIAS, M. A. Whole Genome Analysis of *Leptospira licerasiae* Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 10, p. e1853, 2012.

RODRIGUES, D.; FARINHA-ARCIERI, L. E.; VENTURA, A. M.; CHURA-CHAMBI, R. M.; MALAVASI, N. V.; LEMKE, L. S.; GUIMARÃES, J. S.; HO, P. L.; MORGANTI, L. Effect of pressure on refolding of recombinant pentameric cholera toxin B. *Journal of Biotechnology*, v. 173, n. 1, p. 98–105, 2014.

ROSANDER, A.; GUSS, B.; FRYKBERG, L.; BJÖRKMAN, C.; NÄSLUND, K.; PRINGLE, M. Identification of immunogenic proteins in *Treponema phagedenis*-like strain V1 from digital dermatitis lesions by phage display. *Veterinary Microbiology*, v. 153, n. 3-4, p. 315–322, 2011.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 1–17, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p

SILVA, F. J.; CONCEIÇÃO, W. L. F.; FAGLIARI, J. J.; GIRIO, R. J. S.; DIAS, R. A.; BORBA, M. R.; J, A. S. F.; CONCEIÇÃO, W. L. F.; FAGLIARI, J. J.; GIRIO, R. J. S.; DIAS, R. A.; BORBA, M. R. Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no. v. 32, n. 4, p. 303–312, 2012.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 1985.

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

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

TEMPLETON, T. J. The varieties of gene amplification, diversification and hypervariability in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 166, n. 2, p. 109–116, 2009.

THOMSON, C. A.; OLSON, M.; JACKSON, L. M.; SCHRADER, J. W. A Simplified Method for the Efficient Refolding and Purification of Recombinant Human GM-CSF. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, p. 1–6, 2012.

TIKUNOVA, N. V; MOROZOVA, V. V. Phage display on the base of filamentous bacteriophages: application for recombinant antibodies selection. *Acta naturae*, v. 1, n. 3, p. 20–28, 2009.

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; KUMAGAI, I.; ARAKAWA, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, v. 28, n. 1, p. 1–8, 2003.

VERMA, A.; BRISSETTE, C. A.; BOWMAN, A. A.; SHAH, S. T.; ZIPFEL, P. F.; STEVENSON, B. Leptospiral endostatin-like protein a is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infection and Immunity*, v. 78, n. 5, p. 2053–2059, 2010.

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

VIEIRA, J.; MESSING, J. Production of Single-Stranded Plasmid DNA. In: WU, R.; GROSSMAN, L.; MOLDAVE, K. (Ed.). *Recombinant DNA Methodology*. San Diego: Academic Press Inc., 1989. p. 225–233.

VIEIRA, M. L.; DE MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. *Journal of Infection*, v. 60, n. 1, p. 52–64, 2010.

VIEIRA, M. L.; FERNANDES, L. G.; DOMINGOS, R. F.; OLIVEIRA, R.; SIQUEIRA, G. H.; SOUZA, N. M.; TEIXEIRA, A. R. F.; ATZINGEN, M. V.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. *FEMS Microbiology Letters*, v. 352, n. 2, p. 129–139, 2014.

WHO. Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. p. 1–37, 2011.

YAMAGUCHI, H.; MIYAZAKI, M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules*, v. 4, n. 1, p. 235–51, 2014.

YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, v. 33, n. 1, p. 103–119, 1985.

ZHENG, H.; MIYAKAWA, T.; SAWANO, Y.; YAMAGOE, S.; TANOKURA, M. Expression, high-pressure refolding and purification of human leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2). *Protein Expression and Purification*, v. 88, n. 2, p. 221–229, 2013.

ZUERNER, R. L. Family IV. Leptospiraceae Hovind-Hougen 1979, 245AL emend. Levett, Morey, Galloway, Steigerwalt and Ellis 2005, 1499. In: KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; BROWN, D. R.; HEDLUND, B. P.; PASTER, B. J.; WARD, N. L.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W. B. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer, 2010. p. 546–563.

ANEXOS

A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA (CEUAIB)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Identificação e avaliação de novas adesinas em *Leptospira interrogans* por shotgun phage display", **protocolo nº 1331/14**, sob a responsabilidade de Paulo Lee Ho e Fabiana Lauretti Ferreira – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 19/11/2014.

This is to certify that the proposal "Identification and evaluation of new adhesins of *Leptospira interrogans* by shotgun phage display", **protocol nº 1331/14**, under the responsibility of Paulo Lee Ho and Fabiana Lauretti Ferreira – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 11/19/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 11/2014 - 07/2015	**N° de animais/espécie**
Centro de Biotecnologia	72 Camundongos Balb/c 18-22g (F)

São Paulo, 25 de novembro de 2014

Dra. Wafa H. K.Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

B – SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Fabiana Lauretti Ferreira
Local e data de nascimento: Santos/SP - Brasil; 31/03/1990.

2. EDUCAÇÃO

Colégio Objetivo, Santos/SP; 2007.
Ensino Médio (2° Grau)

Universidade de São Paulo, São Paulo/SP; 2013.
Graduação em Ciências Biológicas

Universidade de São Paulo, São Paulo/SP; 2015 (em andamento).
Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica)

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

1. Protein-Nucleic Acid Interactions. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo/SP; 2014.

2. Soros e Vacinas: Produção e Aplicação. Instituto Butantan, São Paulo/SP; 2011.

3. Biotecnologia e suas Aplicações. Renova Cursos, São Paulo/SP; 2010.

4. Treinamento no uso de animais de experimentação. Universidade de São Paulo, São Paulo/SP; 2010.

5. Treinamento em Biossegurança. Universidade de São Paulo, São Paulo/SP; 2010.

6. Imunoterapia de Tumores. Universidade de São Paulo, São Paulo/SP; 2010.

7. Terapia Gênica: de pesquisa básica a aplicada. Universidade de São Paulo, São Paulo/SP; 2009.

8. Apoptose. Universidade de São Paulo, São Paulo/SP; 2008.

9. Ciclo Celular: do laboratório ao leito. Universidade de São Paulo, São Paulo/SP; 2008.

10. Vacina anti-câncer. Universidade de São Paulo, São Paulo/SP; 2008.

4. OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo; Agosto/2013 a Julho/2015.

5. PUBLICAÇÕES

Resumos publicados em anais de congressos

1. **LAURETTI, F. F.**; TEIXEIRA, A. A. R.; GIORDANO, R. J.; HO, P. L. Identification and Evaluation of New Adhesins of Leptospira interrogans by Shotgun Phage Display. In: *18th Annual Conference on Vaccine Research Program Agenda and Abstract Book*. 18th Annual Conference on Vaccine Research, Bethesda/MD, 2015. v. 18.

2. MEDINA-ARMENTEROS, Y.; FARINHA-ARCIERI, L. E.; **LAURETTI, F. F.**; VENTURA, ARMANDO MORAIS. Construction of DNA Vaccines Based on a Peptide Derived from the Human Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein G. In: *Journal of the Brazilian Society for Virology*. XXII Encontro Nacional de Virologia/VI Encontro de Virologia do Mercosul, Atibaia/SP, 2011. v. 16.