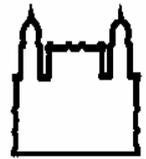




UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**Caracterização de Mutantes de *Leptospira* spp. na
Identificação de Fatores de Virulência**

Cláudio Pereira Figueira

SALVADOR – BAHIA – BRASIL

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

Caracterização de Mutantes de *Leptospira* spp. na Identificação de Fatores de Virulência

CLÁUDIO PEREIRA FIGUEIRA

Orientador: Marcos André Vannier dos Santos

Co-orientador: Albert Icksang Ko

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Doutor.

Salvador – Bahia – Brasil

2011

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Figueira, Cláudio Pereira
F475c Caracterização de mutantes de *Leptospira* spp. na identificação de fatores de virulência [manuscrito] / por Cláudio Pereira Figueira. - 2011.
53 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).
Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2011.
Orientador: Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos, Laboratório de Biomorfologia Parasitária.

1. Leptospira. 2. Fatores de Virulência. 3. Mutagênese. I. Título.

CDU 616.986

*À Ilza, pela companhia, paciência e incentivo constante.
À Annia, minha filhinha querida, obrigado por ter nascido.
Aos meus pais, Dilma e Oscar (in memoriam), meus irmãos e amigos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores:

Dr. Albert Icksang Ko;

Dr. Mitermayer Galvão dos Reis;

Dr. Marcos André Vannier dos Santos;

Aos colaboradores estrangeiros, em especial ao Dr. Mathieu Picardeu - Instituto Pasteur-Paris;

A Elsie Augusto Wunder Júnior pela amizade, colaboração no trabalho, pela revisão do texto da tese e pela disponibilidade em sempre ajudar;

A Julio Croda e a Paula Ristow pela participação essencial no desenvolvimento dos mutantes;

Aos colegas do LPBM, em especial a Andrea, Alcinéia, Jaqueline e Monique pelas importantes contribuições nas atividades do Laboratório;

Aos colegas do Serviço de Histotecnologia: Cláudia, Elisângela e Elmir Matheus, na preparação das lâminas histológicas deste estudo;

À Adriana Lanfredi Rangel pela revisão do texto da tese e pelo apoio durante a tese;

Ao José Maurício Albuquerque Cunha pela revisão do texto da tese;

À Maria Lúcia pelo apoio no Serviço de Microscopia Eletrônica;

Ao CPqGM – Fiocruz pela infraestrutura;

Ao CNPq e a Fapesb pelo apoio financeiro;

À minha família, que me proporcionou o aconchego necessário para desenvolver este trabalho.

“O correr da vida embrulha tudo,
a vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem ...”

Guimarães Rosa

Resumo

O gênero *Leptospira* inclui espécies não patogênicas, que vivem exclusivamente no ambiente, assim como espécies patogênicas capazes de infectar o homem e animais. Há poucos anos, os genomas de três espécies patogênicas e de uma não patogênica foram sequenciados. *Leptospira interrogans* é a principal espécie causadora da leptospirose humana, especialmente nas áreas urbanas do Brasil, e cerca de 1200 genes podem estar associados à virulência na *L. interrogans*. Ferramentas moleculares, capazes de modificar geneticamente espécies de leptospirosas, são essenciais para a compreensão do papel funcional destes genes. Neste trabalho, foram caracterizados mutantes obtidos por diferentes abordagens moleculares para avaliação de potenciais fatores de virulência em *L. interrogans*. Utilizando-se a técnica de mutagenese randômica, por meio da inserção do transposon Himar1, foi obtido um mutante com o gene interrompido da lipoproteína Loa22, a qual possui um segmento idêntico ao domínio OmpA. Verificou-se que a ausência de Loa22 levou a perda de virulência desta bactéria em modelos animais, enquanto que o mutante com o gene *loa22* reconstituído voltou a apresentar virulência semelhante à cepa selvagem original, sendo a primeira descrição de um fator de virulência em leptospirosas. Para avaliar especificamente o papel da LigA e da LigB, proteínas com várias evidências de associação com virulência, duas estratégias foram utilizadas: a recombinação homóloga por mutação dirigida para obter a deleção do gene *ligB* em *L. interrogans* cepa L1130; e um plasmídeo replicativo para a inserção do gene *ligA* e *ligB* em *L. biflexa*. Como resultado, verificou-se que a ausência de LigB não é suficiente para provocar a perda de virulência da *L. interrogans*; e por fim, foi demonstrado que a expressão heteróloga de LigA e LigB em *L. biflexa* conferiu aumento na adesão em cultura de célula e em fibronectina. Este último estudo mostra que a expressão heteróloga em *L. biflexa* pode servir para caracterizar fatores de virulência do agente causador da leptospirose. O conjunto destes achados contribui para a compreensão da patogênese da leptospirose e poderá cooperar no desenvolvimento uma vacina eficaz para o controle da transmissão desta doença e para obtenção de novos métodos de diagnóstico para leptospirose.

Abstract

The genus *Leptospira* includes non-pathogenic free-living and pathogenic species that can infect humans and animals. Recently the genome of four species, including a non-pathogenic one, was published. *Leptospira interrogans* is the main species that causes human leptospirosis, especially in the urban areas of Brazil, and about 1200 genes may be associated with virulence in this specie. For that reason, molecular tools used to genetically modify this agent are essential to understanding the biology of the agent and the role of these genes. In this work, mutants obtained by different molecular approaches were characterized to identify potential virulence factors in *L. interrogans*. The random mutagenesis with Himar1 transposon was used to obtain a mutant with interruption of the gene *loa22*, which product is a described protein with a predicted OmpA domain. The mutant showed loss of virulence in animal models, and the virulence was restored with the complementation with the homologous gene, becoming the first description of a virulence factor in leptospires. To evaluate the role of LigA and LigB, described putative virulence factors in leptospires, two different approaches were used: allelic exchange using targeted mutagenesis to disrupt the *ligB* gene in *L. interrogans* strain Fiocruz L1 130; and the use of replicative plasmid to insert the heterologous genes of *ligA* and *ligB* in the *L. biflexa*. As result, we showed that the absence of LigB is not sufficient to cause the loss in the virulence of *L. interrogans*; and it was also shown that heterologous expression of LigA and LigB in *L. biflexa* confers enhanced adhesion to cell culture and fibronectin. This study indicates that *L. biflexa* can serve as a surrogate host to characterize the role of virulence factors in *Leptospira* sp. .These results contribute to a better understanding of the pathogenesis of leptospirosis and may be important in studies for the development of an effective vaccine and new diagnostic methods.

1. Leptospira. 2. Virulence factors. 3. Mutagenesis

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Aspectos Gerais.....	10
1.2. <i>Leptospira</i> spp.....	12
1.3. Leptospirose: doença humana, diagnóstico laboratorial e prevenção	15
1.4. Patogênese e Imunologia da Leptospirose.....	18
1.5. As Proteínas LIGs.....	23
1.6. Manipulação genética de <i>Leptospira</i> spp.	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo Geral:.....	31
3.2. Objetivos Específicos	31
4. MANUSCRITO I.....	32
5. MANUSCRITO II.....	33
6. MANUSCRITO III.....	34
7. DISCUSSÃO	35
8. CONCLUSÕES	43
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
7. ANEXO	53

Lista de Abreviaturas

BSA – Albumina de soro bovino

ECM – Matriz extracelular

EMJH – Meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

Lig – Leptospiral Immunoglobulin-like

LPS - Lipopolissacarídeo

MAT - Microaglutinação

MSCRAMM - “Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules”

SPHG - Síndrome Pulmonar Hemorrágica Grave

PBMC – Célula mononuclear de sangue periférico

OmpA – Proteína de membrana externa A

1. Introdução

1.1. Aspectos Gerais

A leptospirose é uma zoonose causada pela infecção por espécies de bactérias do gênero *Leptospira*. Ela ocorre em diferentes regiões do globo, sendo mais comum em áreas tropicais e subtropicais onde a ocorrência de chuva é mais freqüente (BHARTI *et al.*, 2003). Estima-se que cerca de 500.000 casos de leptospirose grave sejam registrados a cada ano, com taxa de letalidade superior a 10% (WHO, 1999). Na última década, a leptospirose foi reconhecida como uma importante doença infecciosa emergente no mundo. Vários fatos contribuíram para o alerta a respeito desta doença, tais como: registros de surtos no Brasil (KO *et al.*, 1999), Nicarágua (TREVEJO *et al.*, 1998), Índia (SHARMA *et al.*, 2006), sudeste da Ásia (TANGKANAKUL *et al.*, 2000) e Estados Unidos (MORGAN *et al.*, 2002; STERN *et al.*, 2010) o aumento da incidência da doença nestas regiões; e o surgimento de uma forma clínica mais letal, a síndrome hemorrágica pulmonar grave (LEVETT, 2001; MCBRIDE *et al.*, 2005; VIJAYACHARI *et al.*, 2008).

Os ratos (*Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*) são os principais reservatórios para infecção humana no Brasil (TUCUNDUVA *et al.*, 2007), os quais se mantêm infectados assintomáticos por longo período. As leptospirosas colonizam densamente os túbulos proximais renais destes animais e são eliminadas por meio da urina, contaminando assim o ambiente. No ambiente, as leptospirosas podem sobreviver por meses no solo e na água em condições favoráveis de umidade e temperatura (SMITH & SELF, 1955). A transmissão para o homem ocorre através do contato direto ou indireto com tecido, fluidos corporais ou urina de animais reservatórios infectados. A transmissão direta ocorre principalmente entre trabalhadores que

manipulam animais contaminados como bois e cães, dentre outros, enquanto que a transmissão indireta se dá por meio do contato com água ou solo contaminado. Em ambos os casos a pele lesionada ou mucosa de indivíduos são as vias de entrada da bactéria (FAINE *et al.*, 2000).

A maioria dos casos de leptospirose ocorre em áreas pobres rurais ou urbanas dos países em desenvolvimento. Já nos países desenvolvidos, os casos estão mais associados às atividades de esportes aquáticos (BHARTI *et al.*, 2003). As mudanças sócio-geográficas observadas desde o último século nos países em desenvolvimento, como o estabelecimento de grandes centros urbanos, a migração maciça de pessoas da área rural para estes centros e o surgimento de grandes aglomerados de residências sem saneamento básico, contribuíram para o aumento de casos em áreas urbanas em países, como o Brasil (MCBRIDE *et al.*, 2005). Algumas condições estimadas para os próximos anos podem contribuir para aumentar mais ainda o número de casos desta doença, como a perspectiva de dobrar a população que moram em favelas até o ano de 2025 (UNITED NATIONS, 2003) e o aumento na ocorrência de chuvas torrenciais e alagamentos, resultante das mudanças climáticas provocadas pelo efeito estufa (PLANK & DEAN, 2000). Diante deste cenário, medidas profiláticas, como o desenvolvimento de uma vacina eficaz, é de grande importância para o controle da doença (MCBRIDE *et al.*, 2005).

Apesar de a doença ter sido descrita a mais de um século, muitos aspectos da patogênese da leptospirose continuam sendo desconhecidos (KO *et al.*, 2009; FRAGA *et al.*, 2011). O pouco conhecimento neste aspecto da doença torna-se uma barreira para o desenvolvimento de novas medidas profiláticas e terapêuticas. Nos últimos anos, entretanto, o sequenciamento do genoma de três espécies

(NASCIMENTO *et al.*, 2004; PICARDEAU *et al.*, 2008; BULACH *et al.*, 2006), sendo duas virulentas e uma saprófita, além do surgimento de ferramentas moleculares, tem permitido o avanço na compreensão da biologia da leptospira e da patogênese da doença (XUE *et al.*, 2009; CINCO, 2010).

1.2. Leptospira spp.

As leptospirosas são bactérias pertencentes ao filo *Spirochaete*, ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae* e gênero *Leptospira*. Além das *Leptospiras* spp, outras espécies de bactérias patogênicas pertencem ao filo *Spirochaete*, como o *Treponema pallidum* e a *Borrelia burgdorferi*, agentes da sífilis e da doença de Lyme, respectivamente. O nome deste filo faz referência ao formato helicoidal que o conjunto destas bactérias apresenta. As leptospirosas possuem dimensão de 0,1 a 0,25µm de espessura e 6 a 20µm de comprimento. Elas são móveis e formam um gancho característico na porção terminal, em uma ou ambas as extremidades. Para a sua visualização no laboratório utiliza-se rotineiramente o microscópio de campo escuro, em função da sua fina espessura (FAINE *et al.*, 2000).

Seu metabolismo é aeróbio obrigatório com ótimo crescimento em temperatura entre 28 a 30 °C. Crescem em meio enriquecido com vitaminas B1 e B12, ácidos graxos de cadeia longa e sais de amônio (FAINE *et al.*, 2000). Os ácidos graxos são utilizados como fonte de carbono e são metabolizados por β-oxidação (FAINE *et al.*, 2000). Atualmente, o meio líquido EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) é o mais utilizado rotineiramente para a manutenção das culturas. Neste meio está presente um ácido oléico, um polissorbato (TWEEN) e albumina de soro bovino (BSA). Além do meio líquido, são utilizados o meio semi-sólido e o meio sólido, o qual tem o acréscimo de ágar, e são utilizados,

respectivamente, para a manutenção por período mais prolongados de cultura (de 15 a 30 dias) e para isolamento de colônias (FAINE *et al.*, 2000; LEVETT, 2001).

As leptospiros são formadas por uma membrana externa, um espaço periplasmático, uma membrana interna e por um cilindro protoplasmático. A estrutura de membrana apresenta características mistas de bactérias gram-negativas e gram-positivas. A membrana externa apresenta moléculas de LPS associadas, que são responsáveis pela variabilidade de sorovares (FAINE *et al.*, 2000), além de diferentes lipoproteínas, como LipL32, LipL41, Ligs, dentre outras (CULLEN *et al.*, 2005; MATSUNAGA *et al.*, 2003). Entre a membrana externa e a membrana interna, existe o *espaço periplasmático* onde se localiza dois flagelos, que são chamados de *filamento axial* ou *endoflagelo*. Um pólo de cada flagelo se conecta opostamente nas extremidades da bactéria por meio de um complexo de peptidoglicano. Estas estruturas são essenciais para motilidade da bactéria e podem ser visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. Após o espaço periplasmático, localiza-se a parede celular de peptidoglicano, a qual está associada à membrana plasmática. Por fim, o protoplasma, onde está distribuída a aparelhagem metabólica e genômica da bactéria (FAINE *et al.*, 2000; BHARTI *et al.*, 2003).

O gênero *Leptospira* possui espécies saprófitas, que vivem no ambiente, e patogênicas, que podem infectar o homem ou animais. Até 1989, o gênero era dividido em duas espécies, *Leptospira biflexa* e *Leptospira interrogans*, as quais representavam, respectivamente, as leptospiros saprófitas e as patogênicas. Ambas as espécies eram divididas em diferentes sorovares, baseada na variabilidade do LPS (LEVETT, 2001). A partir desta classificação, foram identificados mais de 260 sorovares entre a *L. interrogans* e mais de 60 sorovares entre a *L. biflexa*

(VIJAYACHARI *et al.*, 2008). Cada um destes sorovares possui uma cepa referência, a exemplo da cepa RGA que é a cepa referência para o sorovar icterohaemorrhagiae (VIJAYACHARI *et al.*, 2008). Os sorovares relacionados antigenicamente são agrupados em sorogrupos. A *L. interrogans* possui 24 sorogrupos, a exemplo do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, onde estão agrupados os sorovares icterohaemorrhagiae, copenhageni e lai. Alguns destes sorovares são associados ao reservatório animal, como ocorre com os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni associados à colonização em ratos, e o sorovar canicola a cães (BHARTI *et al.*, 2003).

Outra classificação foi desenvolvida baseada na técnica molecular de hibridização de DNA-DNA. A partir desta foram determinadas vinte espécies entre leptospiros patogênicas e não-patogênicas (BHARTI *et al.*, 2003). A classificação baseada no genoma permitiu demonstrar a variabilidade genética deste gênero e possui valor taxonômico a despeito da anterior. Entretanto, a classificação baseada na antigenicidade (fenótipo) ainda é utilizada devido a sua importância clínico-epidemiológica. Não há correlação entre as duas classificações, assim, um sorogrupo ou até um sorovar pode ser representado por mais de uma espécie (BHARTI *et al.*, 2003).

Como referido anteriormente, há alguns anos os genomas de duas espécies patogênicas e uma saprófita foram sequenciados. Das patogênicas foram sequenciadas duas cepas da *L. interrogans*, a cepa Fiocruz L1-130, sorovar Copenhageni e a cepa 56601, sorovar Lai (NASCIMENTO *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2003) e duas cepas da *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis (BULACH *et al.*, 2006). Da espécie saprófita, foi sequenciada a *L. biflexa* sorovar Patoc, cepa Patoc I

(PICARDEAU *et al.*, 2008). As espécies patogênicas apresentam dois cromossomos circulares, sendo o maior deles (*CI*) com aproximadamente 4,3Mb e o menor (*CII*) com aproximadamente 350kb (NASCIMENTO *et al.*, 2004); enquanto que a espécie saprófita além dos cromossomos *CI* e *CII*, possui um terceiro cromossomo com apenas 74kb, denominado de *p74* (PICARDEAU *et al.*, 2008).

As espécies sequenciadas possuem peculiaridades quanto ao ambiente de sobrevivência e patogenicidade. A *L. biflexa* sobrevive apenas no ambiente, a *L. borgpetersenii* não possui habilidade para sobreviver no ambiente e a *L. interrogans* sobrevive tanto no ambiente como no hospedeiro (PICARDEAU *et al.*, 2008; REN *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004). Estas diferenças têm sido correlacionadas ao genoma destas espécies e permitido a identificação de grupos de genes, exclusivos ou comuns, envolvidos com o metabolismo, sobrevivência, colonização e virulência (PICARDEAU *et al.*, 2008). Além disso, o sequenciamento do genoma permitiu a aplicação de novas metodologias para os estudos pós-genômicos como transcriptomas (YANG *et al.*, 2006; PATARAKUL *et al.*, 2010) e proteômicas (ESHGHI *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2009; BECK *et al.*, 2009), avançando para o entendimento funcional dos genes identificados.

1.3. Leptospirose: doença humana, diagnóstico laboratorial e prevenção

A leptospirose humana é uma doença com apresentação clínica variada. Na fase inicial apresenta sintomas inespecíficos, como febre, cefaléia e mialgia, podendo ser confundida com outras doenças febris típicas em áreas endêmicas, como gripe, dengue, hepatites e febre tifóide (MCBRIDE *et al.*, 2005). A sufusão conjutival foi identificada como patognomônico para a leptospirose, entretanto, a observação deste sinal é pouco freqüente nos casos clínicos (KATZ *et al.*, 2001).

O período de incubação médio da leptospirose humana é de sete a quatorze dias. Estima-se que 90% dos casos da doença evoluem como forma subclínica ou com sintomas leves de uma doença febril autolimitada (PLANK & DEAN, 2000). Porém, a menor proporção evolui para uma doença grave e potencialmente letal. Dois quadros da doença grave se distinguem: (i) a doença de Weil, caracterizada por icterícia, disfunção renal e sangramento, com taxa de fatalidade entre 5 a 15%; e a (ii) síndrome pulmonar hemorrágica grave associada à leptospirose (SPHG), caracterizada por pneumonite e sangramento pulmonar maciço, com fatalidade superior a 50% (MCBRIDE *et al.*, 2005). Ambos os quadros necessitam de tratamento médico especializado, com longo período de internamento em unidade de terapia intensiva e realização de procedimentos complexos como hemodiálise e ventilação mecânica (ANDRADE *et al.*, 2007). A alta letalidade e o tratamento dispendioso tornam a leptospirose uma doença de grande impacto econômico, exigindo intervenções do Estado para sua prevenção (SOUZA *et al.*, 2011).

O diagnóstico laboratorial pode ser feito por meio da observação direta, pelo isolamento da bactéria ou por meio de sorologia (FAINE *et al.*, 2000). A observação direta é realizada pela análise de amostra de sangue, urina ou líquido em microscópio de campo escuro. Entretanto, este método é pouco utilizado em função da sua baixa sensibilidade e especificidade. O isolamento é feito a partir da inoculação da amostra do paciente em meio de cultura específico, EMJH. O crescimento de leptospira é avaliado nesta cultura por meio da observação em microscópio de campo escuro, semanalmente até três meses. Geralmente é utilizada amostra de sangue do paciente na fase aguda da doença, contudo, outras amostras como líquido, urina ou fragmento de tecido também podem ser utilizadas no isolamento.

Embora a técnica de isolamento seja sensível e específica, o longo período de execução e a necessidade de laboratório especializado dificultam a sua utilização na prática clínica (LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 2000; WHO, 2003; MCBRIDE *et al.*, 2005)

A sorologia é mais utilizada na rotina médica para diagnóstico laboratorial. Dentre os métodos utilizados, existem a microaglutinação (MAT), hemoaglutinação, aglutinação de látex e ELISA. O método sorológico considerado de referência atualmente é a MAT. Este método baseia-se na avaliação por microscópio de campo escuro da capacidade do soro do paciente aglutinar leptospiras vivas. Para obter melhor sensibilidade, são necessárias amostras pareadas, ou seja, uma retirada em fase inicial e outra na fase convalescente, permitindo assim avaliar a soroconversão. Porém, este procedimento pode levar mais de quinze dias, além de necessitar de laboratórios especializados para a realização do ensaio (FAINE *et al.*, 2000). O ELISA, utilizado na rotina atualmente, baseia-se na reação contra o antígeno total de leptospira, porém, outras gerações deste teste têm sido desenvolvidas utilizando-se antígenos recombinantes (MCBRIDE *et al.*, 2005).

O tratamento com antibióticos, como doxiciclina ou penicilina, na fase inicial da doença promove benefícios importantes ao paciente, como redução da duração da doença (KATZ *et al.*, 2001). Diante disso, métodos laboratoriais rápidos e de fácil execução podem auxiliar na rotina clínica, diminuindo o diagnóstico equivocado com outras doenças febris e possibilitar agilidade nas condutas para o tratamento. A busca na identificação de novos antígenos aplicados a métodos como ELISA e imunocromatografia, tem sido uma das abordagens para o desenvolvimento de *kits* para diagnóstico rápido (MCBRIDE *et al.*, 2005) .

A vacinação é uma importante medida de prevenção para doenças infecciosas. Atualmente, países como Cuba, França e China, utilizam vacina contra leptospirose cuja formulação é constituída por bactérias inativadas de um ou mais sorovares, presentes no respectivo país. Este tipo de formulação, embora promova proteção, possui desvantagens significativas, como: tempo de memória imunológica reduzido, frequentes efeitos colaterais e proteção limitada ao sorovar utilizado na vacina. O desenvolvimento de uma vacina mais segura e eficaz para leptospirose tem sido objeto de estudo para muitos trabalhos. Uma das principais abordagens é a utilização de antígenos recombinantes. Segmentos ou moléculas inteiras presentes na superfície de leptospirosas têm sido testados como antígeno vacinal, a exemplo da LigA, LigB, LipL32, LipL41 e OmpL1, obtendo resultados promissores (KO *et al.*, 2009).

1.4. Patogênese e Imunologia da Leptospirose

A leptospira é capaz de penetrar no organismo do hospedeiro através de soluções de continuidade da pele ou mucosa (LEVETT, 2001). Uma vez vencendo a primeira barreira de proteção do hospedeiro, rapidamente as leptospirosas disseminam-se pela via hematogênica e atingem diferentes órgãos, como pulmão, fígado, músculo esquelético, globo ocular e rim (FAINE *et al.*, 2000). A adesão de patógenos na célula do hospedeiro é na maioria das vezes essencial para o estabelecimento de infecção (COSSART & SANSONETTI, 2004). Leptospirosas são capazes de aderir em diferentes tipos celulares, como células endoteliais, células epiteliais de rim, macrófagos e fibroblastos (MERIEN *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2007; THOMAS & HIGBIE, 1990). Embora sejam bactérias extracelulares, leptospirosas patogênicas conseguem invadir células e podem atravessar rapidamente

monocamada de célula epitelial sem provocar dano celular, permanecendo transitoriamente no interior destas células (BAROCCHI *et al.*, 2002; THOMAS & HIGBIE, 1990; HAAKE & LOVETT, 1994). Entretanto, outro mecanismo para translocação epitelial foi descrito recentemente, onde leptospiras patogênicas, ao contrário de leptospiras avirulentas, induzem modificações no citoesqueleto de células endoteliais, provocando contração e formando espaços entre elas, permitindo, desta forma, a passagem das leptospiras entre as células (MARTINEZ-LOPEZ *et al.*, 2010).

A pele, quando lesionada, expõe a matriz extracelular (ECM) ao meio externo, sendo uma porta de entrada para a infecção (MARTIN, 1997). A capacidade de adesão à ECM pode ser importante para a fixação da leptospira na lesão, pela qual penetra no organismo do hospedeiro, bem como na colonização de órgãos do hospedeiro. As leptospiras virulentas possuem maior capacidade de adesão a ECM (ITO & YANAGAWA, 1987) e a invasão celular (BAROCCHI *et al.*, 2002; MERIEN *et al.*, 1997), quando comparada com leptospiras saprófitas e atenuadas. Diferentes moléculas de superfície apresentam afinidade à ECM, a exemplo da LigB e LigA (CHOY *et al.*, 2007), uma proteína de 36kDa ligante de fibronectina (MERIEN *et al.*, 2000), LipL32 (HAUK *et al.*, 2008) e proteínas Len (STEVENSON *et al.*, 2007) e devem participar da intermediação da adesão da leptospira com as células do hospedeiro durante a infecção. Além disso, foi identificado por técnicas de bioinformática, 226 genes que codificam proteínas da membrana externa (YANG *et al.*, 2006) e que podem estar envolvidas na etapa de adesão. A classe de adesinas da superfície celular de bactérias que interage especificamente com componentes da matriz extracelular é chamada de MSCRAMM. Tais componentes podem estar

envolvidos como fator de virulência na colonização do tecido do hospedeiro e invasão (PATTI *et al.*, 1994).

Uma vez vencendo a primeira barreira de proteção, a leptospira é capaz de evadir do sistema imune inato (JOHNSON & HARRIS, 1967; JOHNSON & MUSCHEL, 1966). Nos últimos anos têm sido elucidados alguns mecanismos desenvolvidos pela leptospiras que são responsáveis pelo escape da ação do complemento (FRAGA *et al.*, 2011). Foi identificado que as proteínas LenA e LenB (Leptospiral Endostatin-like Protein) são capazes de se ligarem ao Fator H, inibindo a ativação da via alternativa do complemento (STEVENSON *et al.*, 2007; VERMA *et al.*, 2006). Já a proteína LcpA24 (leptospiral complement regulator acquiring protein A), presente na superfície de leptospiras patogênicas, é capaz de ligar a proteína regulatória C4BP, inibindo a ativação de complemento tanto pela via clássica como pela via de lectina (BARBOSA *et al.*, 2010).

A resposta imune humoral exerce função importante para o controle da infecção de leptospiras (FAINE *et al.*, 2000). Quando INADA e cols., em 1916, publicaram a descoberta do agente etiológico da leptospirose, foi demonstrado que o soro de pacientes exercia ação protetora em cobaias infectados. O LPS é o principal alvo da produção de anticorpo na resposta protetora contra a leptospira (ADLER & FAINE, 1978). A imunossupressão do compartimento de linfócitos B, por meio da administração de ciclofosfamida, leva camundongos Balb/c resistentes a sucumbirem à infecção por leptospira (ADLER & FAINE, 1976). Além disso, observou-se que as leptospiras patogênicas são pouco fagocitadas e resistem à atividade bactericida de neutrófilos na presença de soro normal (WANG *et al.*, 1984a). Porém, quando são pré-tratadas com anti-soro sorotipo específico, mais de

90% são fagocitadas e destruídas tanto por neutrófilo como por macrófago humano, além de tornarem-se susceptíveis a ação do complemento (WANG *et al.*, 1984b), indicando que a resposta humoral é fundamental para que os elementos da resposta inata exerçam sua ação efetora leptospiricida.

Na resposta imune inata, a molécula de LPS é capaz de ligar-se a receptores reconhecedores de patógenos (PRRs), os quais reconhecem motivos moleculares conservados conhecidos como padrões moleculares associados a patógeno. Entre estes receptores, a leptospira é reconhecida pelo receptor do tipo Toll-like (TLR). Diferente do LPS de bactérias gram-negativas, o LPS da *L. interrogans* é menos endotóxico e ativa macrófagos humanos por meio do TLR2, ao invés do TLR4 como ocorre com outras bactérias (WERTS *et al.*, 2001). A afinidade ao TLR2 é atribuída a estrutura incomum da molécula de lipídio A do LPS da Leptospira (QUE-GEWIRTH *et al.*, 2004).

A participação da imunidade celular na infecção por leptospira também é descrita. A avaliação da resposta celular em sangue total ou PBMC humano mostrou que a estimulação com *L. interrogans* morta leva a produção de IFN- γ , IL-12p40 e TNF- α por linfócitos T e células NK (NAIMAN *et al.*, 2002; FOST *et al.*, 2003; KLIMPEL *et al.*, 2003). Dentre os linfócitos T, há uma expansão predominante da população de linfócitos TCR $\gamma\delta$, ao invés da população com TCR $\alpha\beta$. Os linfócitos T CD8 também podem ser ativados, mostrando especificidade para antígenos de superfície de leptospira, como a proteína LigA (GUO *et al.*, 2010).

Assim como outras doenças infecciosas, o desfecho da infecção é dependente tanto de fatores relacionados ao patógeno como ao hospedeiro. A virulência da leptospira e o seu inóculo, bem como características do hospedeiro,

como padrão genético e o status fisiológico, são variáveis determinantes para o estabelecimento da infecção (KO *et al.*, 2009; MCBRIDE *et al.*, 2005). Alguns animais têm sido utilizados como modelos de infecção para estudos de patogênese, além de estudos para testes de protótipos de vacinas, avaliação de virulência de cepas e outros relacionados. Dentre estes, estão: os camundongos, que são resistentes a infecção; os ratos, que desenvolvem infecção crônica e assintomática (FAINE *et al.*, 2000); e os hamsters e cobaios, que são susceptíveis e sucumbem em poucos dias após a infecção (FAINE *et al.*, 2000).

Os ratos Wistar (*Rattus Norvegicus*) têm sido utilizados como modelo para avaliar a capacidade de colonização de leptospiros patogênicos. Experimentalmente, observa-se que é necessário alto inóculo de *L. interrogans* para se estabelecer sua colonização (ATHANAZIO *et al.*, 2008). Verificou-se que após a infecção as leptospiros disseminam-se rapidamente por diferentes órgãos e a partir do sétimo dia elas ficam restritas ao rim, formando agregados na luz dos túbulos proximais. Esta infecção é persistente, sem alterações clínicas e as alterações histopatológicas, quando encontradas, são discretas (ATHANAZIO *et al.*, 2008).

Hamsters e cobaios são animais susceptíveis a diferentes espécies de leptospiros e são utilizados como modelo padrão para leptospirose aguda (KO *et al.*, 2009). O desfecho de morte nestes animais ocorre poucos dias após a infecção e é dependente do inóculo e da virulência da cepa (SILVA *et al.*, 2008; LOURDAULT *et al.*, 2009). Após a infecção, ocorre a fase de bacteremia, quando as leptospiros circulam no sangue, se multiplicam e se distribuem em diferentes órgãos. Ao atingir um número crítico de leptospiros, a partir do sétimo dia após a infecção, surgem as lesões e em seguida, geralmente, ocorre o óbito do animal. Os principais órgãos

alvos são o pulmão, o fígado e os rins. Nestes órgãos observam-se principalmente as seguintes alterações: no pulmão, hemorragia intensa com rara presença de leptospiros; no fígado, dissociação das traves hepáticas e presença de antígeno de leptospiros no interior de células de kupffer; e no rim, hemorragia, degeneração hidrópica das células tubulares, infiltrado inflamatório mononuclear perivascular e presença frequente de leptospiros no interstício (VAN DEN INGH & HARTMAN, 1986; SILVA *et al.*, 2008).

1.5. As Proteínas LIGs

Em 2002, uma proteína de 130KDa foi identificada a partir da triagem de uma biblioteca genômica de *L. interrogans* sorovar Pomona, a qual foi denominada LigA (PALANIAPPAN *et al.*, 2002). Posteriormente, foi identificado que existiam três proteínas homólogas, constituída pela LigA, LigB e LigC, as quais possuíam em comum o domínio semelhante à imunoglobulina (*Ig-like*), formando a família das proteínas Ligs (MATSUNAGA *et al.*, 2003). O gene *ligC* apresenta uma mutação que interrompe a sua transcrição, sendo considerado assim um pseudogene (MATSUNAGA *et al.*, 2003). O domínio *Ig-like* é característico na superfamília das proteínas Big (*Bacterial Ig-like*), as quais estão presentes em bactérias patogênicas como a *Yersinia pseudotuberculosis* (HAMBURGER *et al.*, 1999) e a *Escherichia coli* enteroinvasiva (LUO *et al.*, 2000). Nestas bactérias, as proteínas Bigs funcionam como invasina e intimina, respectivamente, e são fatores de virulência envolvidos no processo de invasão e de adesão em células do hospedeiro (HAMBURGER *et al.*, 1999; LUO *et al.*, 2000) .

Os genes *ligs* foram identificados apenas em leptospiros patogênicos e a expressão foi demonstrada ser na superfície da célula (MATSUNAGA *et al.*, 2003).

As LigA e LigB possuem regiões homólogas e regiões com diferenças estruturais e na sua composição. As Ligs são ancoradas na membrana externa da leptospira e a região exposta é constituída por domínios Bigs contíguos, sendo que apenas a LigB possui, além dos domínios Bigs, uma região carboxi terminal com 771 resíduos de aminoácidos com aproximadamente 80kDa. A LigA possui 13 domínios Big e a LigB 12. Comparativamente, até o sétimo domínio Big há identidade entre LigA e LigB, e a partir deste domínio há homologia de apenas 38% (SILVA *et al.*, 2007). Considerando toda a molécula, a massa molecular da LigA é de 128kDa e da LigB de 201kDa (MATSUNAGA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2007). A região carboxi terminal da LigB, assemelha-se a da intimina e da invasina, as quais apresentam também esta região alongada com 99 e 106 aminoácidos, respectivamente, e possuem a função de adesão à superfície de células do hospedeiro. Por outro lado, a ausência da região carboxi terminal na LigA não exclui a possibilidade dela atuar como uma adesina, por meio do seus domínios Bigs, podendo exercer funções redundantes (MATSUNAGA *et al.*, 2003).

Estudos avaliando a variabilidade dos genes *ligs*, de cinco espécies patogênicas, verificaram que o gene *ligB* é conservado entre elas e possui identidade que varia de 62 a 99% (MEDEIROS *et al.*, 2005; MCBRIDE *et al.*, 2009). O gene *ligA* foi encontrado exclusivamente em *L. interrogans* e *L. kirschneri*. Já o gene *ligC* foi confirmado como pseudogene, mas na *L. interrogans* sorovar Lai e *L. weilii* sorogrupo Hebdomadis Eco-Challenge, o gene *ligC* é expresso (MCBRIDE *et al.*, 2009). A conservação do gene *ligB* entre espécies patogênicas foi confirmada em outro estudo, ampliando o número para 52 cepas patogênicas testadas (CERQUEIRA *et al.*, 2009).

As proteínas Ligs são imunogênicas e têm sido utilizadas no desenvolvimento de vacinas e como marcador de infecção (MCBRIDE *et al.*, 2005). Alguns segmentos da LigA são capazes de induzir imunidade protetora (KOIZUMI & WATANABE, 2004; PALANIAPPAN *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007; FAISAL *et al.*, 2009). A imunização com segmentos de LigB, por outro lado, tem demonstrado percentual de proteção inferior ao da LigA (SILVA *et al.*, 2007).

As Ligs induzem forte produção de anticorpo em pacientes com leptospirose e em animais infectados, tendo grande potencial como marcador para sorodiagnóstico (MATSUNAGA *et al.*, 2003; KOIZUMI & WATANABE, 2004; PALANIAPPAN *et al.*, 2004; CRODA *et al.*, 2007). Comparado com outras moléculas, como LipL32, LipL41 e GroEL, a LigB demonstrou um desempenho superior para a detecção de pacientes com leptospirose em fase aguda (CRODA *et al.*, 2007). Em relação aos métodos usuais para diagnóstico laboratorial, como MAT e ELISA IgM, o imunoblot com o segmento da LigB teve desempenho superior na detecção de pacientes em fase aguda da doença (CRODA *et al.*, 2007).

A expressão de Lig durante o crescimento de leptospira em cultura axênica é constante e apenas a LigA é excretada ao meio (MATSUNAGA *et al.*, 2005). A osmolaridade é fator chave na regulação da expressão das Ligs, o acréscimo de cloreto de sódio em cultura promove um aumento significativo da expressão de LigA e de LigB (MATSUNAGA *et al.*, 2005). O aumento da expressão de LigA e LigB, induzido pela osmolaridade, é acompanhado com o aumento na capacidade de *L. interrogans* em aderir a alguns componentes da ECM, como colágeno tipo IV, laminina, fibronectina e fibrinogênio, mostrando que estas proteínas podem atuar como adesinas (CHOY *et al.*, 2007). Os segmentos de LigA e LigB recombinantes

possuem afinidade variada a estes mesmos componentes da matriz (CHOY *et al.*, 2007).

Apesar de várias evidências de que as Ligs estão relacionadas com a virulência da leptospira, ainda não foi demonstrado que estas proteínas são fatores de virulência. Estudos envolvendo mutantes, modificados geneticamente, são essenciais para avaliar as funções destas proteínas.

1.6. Manipulação genética de *Leptospira* spp.

A manipulação genética de bactérias patogênicas é uma importante estratégia tanto para o estudo da biologia do microorganismo como para os mecanismos de interação com o hospedeiro e o ambiente. *Leptospira* spp. não possuem plasmídeos e são resistentes a modificação genética. Essas características contribuíram para o escasso desenvolvimento de ferramentas genéticas para as *Leptospira* spp., que por sua vez dificulta o entendimento de diferentes genes de interesse (KO *et al.*, 2009; XUE *et al.*, 2009).

Alguns genes da *L. biflexa* foram isolados por meio da complementação funcional de mutantes de *Escherichia coli*. Nesta técnica, uma biblioteca genômica de *L. biflexa* é formada em um vetor tipo cosmídeo, e em seguida é introduzida em um clone mutante de *E. coli* que não expressa determinado gene. Os clones modificados são selecionados por meio de um marcador específico, como o de resistência a um antibiótico. Em seguida, avalia-se a reconstituição da funcionalidade do gene ausente na *E. coli*. Este método levou a identificação de alguns genes como recombinase A (*recA*) (STAMM *et al.*, 1991), gene *rfb* da *L. interrogans* e de genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos, como aspartato

desidrogenase (*asd*) e gene da biossíntese do triptofano (*trpE*) (BARIL *et al.*, 1992; YELTON & COHEN, 1986).

A primeira metodologia desenvolvida com sucesso para inserção de DNA em leptospira saprófita foi publicada por GIRONIS e cols. em 2000. Neste estudo foram isolados bacteriófagos em água de esgoto, da cidade de Paris - França, denominados LE1, LE2 e LE3. Estes bacteriófagos foram capazes de infectar apenas leptospiros saprófitas, do sorovar Patoc (GIRONIS *et al.*, 1990). Porém, apenas o LE1 não provocava lise da célula alvo e apresentou um comportamento atípico, pois não se incorporava ao genoma da célula hospedeira e se replicava dentro da bactéria semelhante a um plasmídeo. Fragmentos aleatórios do DNA do LE1 foram clonados em um vetor pGEM7Zf(+), com o gene de resistência a kanamicina. Essa construção foi inserida por eletroporação em *L. biflexa* Patoc1, dando origem a clones transformados, resistentes a kanamicina. O fragmento de 2,2kb foi responsável pela replicação em *L. biflexa*. Desta forma, foi obtido o primeiro vetor, contendo a região de replicação do bacteriófago LE1 e o gene de resistência a kanamicina (GIRONIS *et al.*, 2000).

A utilização de transposons tipo *Himar1* foi a primeira experiência bem sucedida para a modificação genética de Leptospiros patogênicos (BOURHY *et al.*, 2005). O transposon *Himar1*, da família *mariner*, originalmente isolada da mosca do chifre, é um dos mais utilizados para a mutagênese aleatória em bactéria e outros organismos (PLASTERK *et al.*, 1999). A obtenção de uma biblioteca de mutantes aleatórios em *L. biflexa*, por meio da utilização de transposons permitiu identificar o sistema de aquisição de ferro utilizado pela *L. biflexa* (LOUVEL *et al.*, 2005). Este mesmo sistema de mutagênese foi utilizado com sucesso em *L. interrogans* e

permitiu a obtenção de 35 mutantes, criando perspectivas da utilização desta abordagem para a identificação de fatores de virulência destas leptospiras (BOURHY *et al.*, 2005).

Outra metodologia aplicada para a modificação genética de *Leptospira* spp. é a mutagênese direcionada por recombinação homóloga (PICARDEAU *et al.*, 2001). Nesta técnica, é introduzido na célula um plasmídeo suicida contendo duas regiões homólogas do gene alvo interligados por um cassete de um gene de resistência a antibiótico, como spectinomomicina. Ao ser inserido na célula, ocorre um pareamento entre as regiões homólogas do genoma da bactéria e do plasmídeo, levando a recombinação do DNA e conseqüente incorporação ao genoma da célula. A célula transformada é selecionada por meio do fenótipo de resistência ao antibiótico. Esta técnica foi aplicada pela primeira vez em *L. biflexa*, tendo selecionado como gene alvo o *flaB*, o qual codifica uma proteína central do flagelo. Os mutantes obtidos apresentaram ausência na expressão deste gene, sendo obtido com sucesso mutantes com o gene *flaB* inativado. Estes mutantes eram imóveis e não possuíam flagelo, demonstrando que FlaB é essencial para a síntese do flagelo (PICARDEAU *et al.*, 2001).

2. Justificativa

A leptospirose é uma doença considerada negligenciada e emergente no mundo nos últimos anos (BHARTI *et al.*, 2003; MCBRIDE *et al.*, 2005). Fatores relacionados à urbanização desordenada e a grande concentração de pessoas em centros urbanos com má condição de moradia e saneamento básico tem contribuído para o aumento do número de casos (PEREIRA; ANDRADE, 1990; KO *et al.*, 1999). Além disso, uma forma pulmonar grave, com maior letalidade, tem sido detectada em países como Brasil, Nicarágua e Índia (MCBRIDE *et al.*, 2005). No Brasil, anualmente ocorrem surtos de leptospirose após períodos chuvosos em comunidades carentes, provocando o adoecimento de mais de 10.000 pessoas/ano (SOUZA *et al.*, 2011). O diagnóstico desta doença é dificultado em função da semelhança dos sintomas nas fases iniciais com outras doenças infecciosas como dengue e hepatite, bem como a ausência de marcadores de infecção. Embora a leptospirose tenha sido descrita há mais de um século, o conhecimento sobre esta doença continua sendo escasso (KO *et al.*, 2009).

Estudos para a compreensão da patogênese são fundamentais para a identificação de candidatos vacinais e marcadores de infecção para diagnóstico (KO *et al.*, 2009). Entretanto, muitos aspectos da leptospirose ainda são pouco conhecidos, tanto relacionados à bactéria quanto ao hospedeiro. O entendimento de cada etapa do processo de infecção, como: fase inicial de interação celular, interação com o sistema imune do hospedeiro e fase de lesão celular, avaliando os fatores envolvidos da leptospira e do hospedeiro, são essenciais para a obtenção de estratégias de controle da doença (ADLER *et al.*, 2011).

O sequenciamento do genoma da *Leptospira* spp. permitiu o direcionamento de estudos para a identificação de fatores virulência (CINCO, 2010). Diferente de outras bactérias de interesse médico, poucas ferramentas moleculares para a manipulação genética de leptospiros foram desenvolvidas (XUE *et al.*, 2009). Um dos fatores da escassez destas ferramentas aplicadas a leptospira, principalmente as patogênicas, se deve a dificuldade de transformação destas bactérias, devido à especificidade da sua aparelhagem genômica e pela dificuldade de isolamento de colônias em meio sólido. Entretanto, a aplicação destas ferramentas é essencial para o estudo funcional dos genes descritos no sequenciamento genômico, servindo para o melhor entendimento da biologia da *Leptospira* spp., bem como para a demonstração de fatores microbianos que possibilitam o estabelecimento da infecção no hospedeiro (XUE *et al.*, 2009).

As proteínas Ligs têm apresentado uma forte associação com virulência. Estas proteínas estão presentes na membrana externa de leptospiros patogênicos e fazem parte de uma superfamília de proteínas com domínio Big (MATSUNAGA *et al.*, 2003). Outras proteínas com domínios Big já foram descritas como fator de virulência, a exemplo da intimina na *Escherichia coli* enteroinvasiva (LUO *et al.*, 2000) e da invasina presente na *Yersinia pseudotuberculosis* (HAMBURGER *et al.*, 1999). Na leptospira foram descritas três proteínas homólogas com estes domínios, denominadas LigA, LigB e LigC (MATSUNAGA *et al.*, 2003). A LigB é a única presente em todas leptospiros patogênicos (MCBRIDE *et al.*, 2009; CERQUEIRA *et al.*, 2009) e é reconhecida precocemente em pacientes com leptospirose (CRODA *et al.*, 2007). Diferentes trabalhos têm demonstrado que LigA e LigB são capazes de aderir à diferentes componentes da matriz extracelular, especialmente a fibronectina (CHOY *et al.*, 2007; MATSUNAGA *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2009). Estes achados sinalizam que as Ligs são essenciais para a virulência de leptospiros, sendo fundamental a melhor compreensão da sua função nos mecanismos patogênicos da leptospirose.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral:

Caracterizar mutantes de *L. interrogans* e *L. biflexa* obtidos por meio da aplicação de ferramentas moleculares a fim de identificar possíveis fatores de virulência.

3.2. Objetivos Específicos

- 3.2.1. Caracterizar um mutante de *L. interrogans* cepa Lai com gene *loa22* interrompido, obtido por mutagênese randômica pela inserção do transposon *Himar*, e avaliar a sua virulência em modelo de infecção experimental;
- 3.2.2. Caracterizar um mutante de *L. interrogans* cepa L1130 com gene *ligB* interrompido por meio de recombinação homóloga e avaliar a sua virulência em modelos de infecção animal e celular;
- 3.2.3. Caracterizar mutantes de *L. biflexa* cepa Patoc1 obtidos pela inserção de plasmídeo replicativo com os genes heterólogos *ligA* ou *ligB*, e avaliar sua capacidade de adesão e invasão em célula de hospedeiro, bem como a sua capacidade de ligação a componentes da matriz extracelular.

4. Manuscrito I

The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence

Paula Ristow^{1,2}, Pascale Bourhy¹, Flávia Weykamp da Cruz McBride³, **Claudio Pereira Figueira**³, Michel Huerre⁴, Patrick Ave⁴, Isabelle Saint Girons¹, Albert I. Ko^{3,5}, Mathieu Picardeau¹

1 Unité de Biologie des Spirochètes, Institut Pasteur, Paris, France;

2 Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Goes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

3 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil;

4 Unité de Recherche et d'Expertise Histotechnologie et Pathologie, Institut Pasteur, Paris, France;

5 Division of International Medicine and Infectious Disease, Weill Medical College of Cornell University, New York, New York, United States of America

5. Manuscrito II

Targeted Mutagenesis in Pathogenic *Leptospira*: Disruption of the LigB Gene Does Not Affect Virulence in Animal Models of Leptospirosis

Julio Croda ^{1, 2}, **Claudio Pereira Figueira** ¹, Elsio A. Wunder Jr. ¹, Mitermayer G. Reis ¹, Albert I. Ko ^{1,3}, and Mathieu Picardeau ⁴

¹ **Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Salvador, Brazil**

² Laboratory of Pathology of Transmissible Diseases, Department of Patology, Medicine School, São Paulo University, São Paulo, Brazil.

³ Division of International Medicine and Infectious Disease, Weill Medical College of Cornell University, New York, New York

⁴ Unité de Biologie des Spirochètes, Institut Pasteur, Paris, France

6. Manuscrito III

Heterologous expression of the pathogen-specific genes *ligA* and *ligB* in the saprophyte *Leptospira biflexa* confers enhanced adhesion to fibronectin and cultured cells

Cláudio Pereira Figueira¹, Julio Croda.¹, Dave A. Haake^{2, 3}, Henry A. Choy^{2, 3}, Albert I. Ko^{1,4}, and Mathieu Picardeau⁵

¹ **Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Salvador, Brazil**

² Division of Infectious Diseases, Veterans Affairs Greater Los Angeles Health Care System, Los Angeles, California, United States of America

³ Department of Medicine, University of California Los Angeles School of Medicine, Los Angeles, California, United States of America

⁴ Division of International Medicine and Infectious Disease, Weill Medical College of Cornell University, New York, New York

⁵ Unité de Biologie des Spirochètes, Institut Pasteur, Paris, France

7. Discussão

O sequenciamento do genoma de leptospiros criou uma oportunidade singular no avanço do entendimento dos mecanismos moleculares para a patogênese da leptospirose. Comparando o genoma de *L. interrogans*, principal espécie causadora de leptospirose humana, e da *L. biflexa*, espécie saprófita que sobrevive apenas no ambiente, estima-se que cerca de 1200 genes podem estar envolvidos com a virulência da *L. interrogans* (PICARDEAU *et al.*, 2008). A caracterização funcional destes genes é uma estratégia importante para obtenção de moléculas que possam ser utilizadas como antígenos vacinais ou para métodos diagnósticos.

Ferramentas moleculares são fundamentais aos estudos de caracterização de genes. A ausência destas ferramentas, capazes de modificar geneticamente leptospiros, tem sido apontada como uma limitação para o avanço no conhecimento do estudo da biologia da leptospira e da patogênese da leptospirose (XUE *et al.*, 2009). O presente trabalho traz algumas contribuições de abordagens aplicadas a modificação do genoma da *L. interrogans*: a mutagênese randômica utilizando o transposon *Himar1 mariner* e a mutagênese direcionada por recombinação homóloga, além da expressão heteróloga em *L. biflexa*, que pode funcionar como um modelo alternativo para avaliar genes de leptospiros patogênicos.

A obtenção de clones mutantes por meio de mutagênese randômica utilizando transposon *Himar1 mariner* permitiu alguns avanços no entendimento da biologia e na investigação de fatores de virulência em *Leptospira spp.* Neste trabalho, o primeiro manuscrito mostra a caracterização de um mutante obtido por esta técnica, permitindo, pela primeira vez, descrever um fator de virulência da *L. interrogans*. Observamos que a interrupção do gene da lipoproteína com domínio OmpA, a

Loa22, levou a atenuação na virulência da *L. interrogans* cepa Lai, testada em modelo experimental de cobaios e hamsters. Utilizando o mesmo plasmídeo, carregando o transposon *Himar1* e o gene integral *loa22*, foi possível reconstituir a expressão deste gene no mutante *loa22*⁻. A reconstituição deste gene restaurou a virulência desta cepa semelhante à cepa selvagem original. Desta forma, foi possível completar o postulado molecular de Koch, permitindo demonstrar que Loa22 é essencial para virulência da *L. interrogans*.

O mecanismo pelo qual Loa22 interfere na virulência de *L. interrogans* ainda não é conhecido. Loa22 foi descrita como uma lipoproteína com domínio OmpA na porção C-terminal, localizada na membrana externa e presente apenas em leptospiros patogênicos (KOIZUMI & WATANABE, 2003). O domínio OmpA presente em outras bactérias, como *E. coli*, está envolvido em diferentes mecanismos patogênicos como adesão celular, invasão de tecidos (TENG *et al.*, 2006) e evasão da resposta imune inata (WOOSTER *et al.*, 2006). Um estudo de proteoma da membrana externa de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, comparando leptospiros cultivadas *in vitro* e isoladas de tecidos de cobaios infectados, mostrou que, dentre as moléculas de superfície, a expressão de Loa22 foi a que aumentou significativamente durante a fase aguda da infecção (NALLY *et al.*, 2007). Outros estudos baseados na análise proteômica consistentemente detectaram aumento na expressão de Loa22 em *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1130, em condições que mimetizam o ambiente *in vivo* (ESHGHI *et al.*, 2009) e com cepa virulenta de *L. interrogans* sorovar Pomona com baixa passagem (VIEIRA *et al.*, 2009). Um estudo avaliando o efeito *in vitro* de Loa22 recombinante em células de túbulos proximais de rato (NRK52E) verificou que esta lipoproteína provocou efeito citotóxico de forma dose dependente, levando a morte celular por necrose, e foi capaz de induzir a

expressão de TLR2 e a produção de NO e da quimiocina MCP-2. Isto indica que Loa22, presente na superfície da leptospira, pode provocar um efeito citotóxico direto e/ou induzir inflamação provocando lesão tecidual. Estes dados sugerem que Loa22 é importante na adaptação da leptospira no organismo do hospedeiro e corrobora com o nosso resultado de que Loa22 é fundamental na virulência da *L. interrogans*.

As proteínas Ligs têm sido alvo de vários trabalhos após a sua descrição. Diferentes evidências sinalizam que as Ligs podem funcionar como fatores de virulência: a presença de domínios Bigs na sua estrutura, semelhante a proteínas como a intimina e a invasina, que também são fatores de virulência, respectivamente, em *E. coli* enteropatogênica e *Yersinia pseudotuberculosis* (MATSUNAGA *et al.*, 2003) ; o fato de estarem presentes apenas nas leptospiiras patogênicas (MATSUNAGA *et al.*, 2003); ter como mecanismo de controle de expressão a osmolaridade, sendo esta semelhante a encontrada no soro do hospedeiro que induz um aumento da sua expressão (MATSUNAGA *et al.*, 2005); ter afinidade com diferentes componentes da matriz extracelular, a exemplo da fibronectina (CHOY *et al.*, 2007) e serem imunogênicas (KOIZUMI; WATANABE, 2004; MATSUNAGA *et al.*, 2003) e reconhecidas pelo hospedeiro em fases iniciais da doença (CRODA *et al.*, 2007). Todas estas evidências ratificam a hipótese de que as Ligs atuam como fator de virulência.

Apesar destas evidências, ainda não havia sido comprovado, seguindo o postulado molecular de Koch, que as Ligs exerciam realmente o papel de fator de virulência. Neste trabalho, o segundo manuscrito apresenta a aplicação da técnica de mutagênese direcionada em *L. interrogans* cepa L1130 por meio de

recombinação homóloga, utilizando plasmídeos suicidas contendo dois segmentos do gene *ligB* ligados por um gene de resistência a spectinomicina. Assim, obtivemos mutantes de *L. interrogans* cepa L1130 com o gene *ligB* interrompido e que não expressavam LigB. Estes mutantes foram caracterizados e confirmou-se a modificação genética pela técnica de PCR e a ausência na expressão de LigB por *western blot* e imunofluorescência, sendo que a expressão de LigA foi preservada. Para avaliar a sua virulência, testamos em modelos de infecção em animais e de infecção *in vitro* em células renais de hospedeiro (MDCK). Observamos que os mutantes *ligB*⁻ preservavam a capacidade de provocar morte em hamsters e de colonizar ratos, semelhante a cepa selvagem original, utilizando os mesmos inóculos, além de manter a capacidade de adesão em células MDCK. Estes resultados, demonstram que LigB não é essencial para a virulência de *L. interrogans*.

O fato do mutante L1130 LigB⁻ apresentar virulência semelhante a cepa selvagem, suscita algumas questões a respeito do papel da LigB na virulência de *L. interrogans*. É possível que outras moléculas, principalmente a LigA, tenham função redundante e a ausência de LigB não provoque nenhuma alteração na virulência. Uma estratégia que pode ser utilizada para sanar esta dúvida é o desenvolvimento de um duplo knockout, *ligB*⁻/*ligA*⁻, afim de verificar se haveria modificação no fenótipo de virulência. Outra questão que deve ser considerada é a limitação do modelo experimental utilizado. Na natureza, a transmissão da leptospirose ocorre por meio da exposição da mucosa ou pele lesionada do hospedeiro à água contaminada por leptospiros eliminadas pela urina de reservatórios. É possível que LigB seja importante na etapa da passagem através da pele lesada ou pela membrana da mucosa. Para testar esta hipótese, uma possibilidade é, ao invés de utilizar a via

intraperitoneal, realizar a infecção através da mucosa, como a conjutiva. Corroborando com esta hipótese, existem estudos que demonstram a afinidade de LigB com componentes da matriz como fibronectina, fibrinogênio, laminina e elastina (CHOY *et al.*, 2007), que estão expostas na pele lesionada. Além disso, dois estudos publicados recentemente demonstraram que segmentos recombinantes de LigB são capazes de inibir parcialmente a formação do tampão de coagulação, por meio da ligação ao fibrinogênio e fibrina (CHOY *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2011) e pode contribuir para disseminação da leptospira no hospedeiro (CHOY *et al.*, 2011). Estes estudos indicam que a etapa inicial da infecção pode ser o momento em que a proteína LigB tenha maior participação na interação com o hospedeiro.

As leptospirosas patogênicas são mais difíceis para a modificação genética. Esta característica contribui para a dificuldade na aplicação de ferramentas moleculares. Ao contrário de leptospirosas saprófitas, leptospirosas patogênicas não incorporam o plasmídeo replicativo contendo a região repícon do fago FE1 (GIRONS *et al.*, 2000). O rendimento na obtenção de leptospirosas patogênicas transformadas utilizando transposon ou recombinação homóloga é baixo, quando comparado com leptospirosas saprófitas. Para ilustrar esta dificuldade, quando foram publicados os primeiros trabalhos demonstrando a utilização do transposon Himar1, foram obtidos 2000 mutantes de *L. biflexa* (LOUVEL *et al.*, 2005), enquanto que para *L. interrogans* foram apenas 35 mutantes (BOURHY *et al.*, 2005). Outro fator, que dificulta os estudos voltados para manipulação genética desta espécie, é o longo tempo de multiplicação: sendo de 4h para as saprófitas e de até 18h para as patogênicas, em meio líquido; para obtenção de colônias em meio sólido, as patogênicas podem levar quatro semanas, enquanto que as saprófitas crescem em uma semana (LOUVEL & PICARDEAU, 2007). Estas dificuldades contribuíram para a escassez de

ferramentas moleculares e desperta a necessidade de outras abordagens que possam acelerar o rastreamento de genes de interesse em leptospiros patogênicos.

O terceiro manuscrito demonstrou a possibilidade de avaliar a expressão de genes de *L. interrogans* em *L. biflexa*. As proteínas LigA e LigB, presentes apenas em leptospiros patogênicos, foram levada a serem expressas em *L. biflexa* cepa Patoc1 e, semelhante ao que acontece com *L. interrogans*, foram localizadas na superfície. Avaliamos a capacidade de invasão, de adesão celular e em matriz extracelular dos mutantes obtidos como marcadores do fenótipo de virulência. As leptospiros transformadas com o gene *ligA* ou *ligB* apresentaram capacidade de invasão quase nula, semelhante a cepa Patoc selvagem e diferentemente da cepa patogênica L1130, que foi capaz de translocar a monocamada celular em cerca de 6%. Esse resultado mostra que a expressão destas proteínas isoladamente não é suficiente para promover a invasão celular. Por outro lado, a cepa PatocLigA apresentou a capacidade de adesão semelhante a L1130, aumentando cerca de quatro vezes quando comparado com *L. biflexa* selvagem. Diferentemente, a cepa PatocLigB não aumentou a capacidade de adesão em células. Atribuímos essa diferença a uma possível degradação da molécula LigB, apresentada na análise por *western blot*. Segmentos recombinantes, tanto de LigA como de LigB possuem afinidade a diferentes componentes da matriz extracelular (CHOY *et al.*, 2007). A inserção dos genes *ligA* ou *ligB* em Patoc promoveu aumento na capacidade de adesão em fibronectina e laminina, mas não em elastina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV. A capacidade de adesão na matriz extracelular é uma importante característica para o estabelecimento de infecção, sendo um marcador de virulência. Estes resultados reforçam o papel das Ligs como MSCRAMM e que é possível

avaliar genes de leptospiros patogênicas por meio da expressão heteróloga em *L. biflexa*.

A expressão heteróloga de genes de *L. interrogans* em *L. biflexa* é mais eficiente comparado quando com a expressão em *E. coli*. Antes de existir as ferramentas moleculares atuais, já havia sido realizada a expressão heteróloga em *E. coli* e foi possível descrever alguns genes da *L. interrogans* (BARIL *et al.*, 1992). Entretanto, esta abordagem apresenta limitações por conta de incompatibilidades com a maquinaria de expressão entre as bactérias, levando a não expressão ou defeitos no processamento das proteínas. Embora sejam filogeneticamente distintas, a *L. biflexa* se aproxima mais da *L. interrogans*, apresentando em comum 2.052 genes, que constitui o núcleo genômico deste gênero (PICARDEAU *et al.*, 2008). Estes genes estão envolvidos em vias fundamentais de sobrevivência, como metabolismo de RNA e DNA, transporte de proteínas, metabolismo energético e processamento de proteínas, o que garante o maior sucesso na expressão heteróloga.

O uso das ferramentas moleculares tem sido utilizado em leptospiros patogênicas na criação de diversos mutantes para estudo de genes. Alguns genes bloqueados por meio da inserção de transposon, ao contrário das expectativas, não promoveram atenuação, a exemplo do gene da mais abundante lipoproteína de superfície da *L. interrogans*, a LipL32 (MURRAY *et al.*, 2008) e dos genes *lenB* e *lenE* (MURRAY *et al.*, 2009), que codificam duas proteínas que fazem parte da família de proteínas, semelhantes a endotastina humana, e se ligam a componentes da matriz como laminina e fibronectina. Por outro lado, outras mutações promoveram atenuação, a exemplo do bloqueio pelo transposon *TnSC189* do gene *hemO* (heme oxigenase) (MURRAY *et al.*, 2008), onde os mutantes apresentaram uma redução

na capacidade de utilizar hemoglobina como fonte de ferro e atenuação na infecção em hamsters. O bloqueio do gene *flaY*, por recombinação homóloga, também gerou mutante de *L. interrogans* com atenuação na virulência (LIAO *et al.*, 2009). Este mutante teve redução na motilidade, diminuição na capacidade de adesão e a letalidade foi mais baixa na infecção em cobaias, porém não foi testado com o mutante reconstituído do gene *flaY* (LIAO *et al.*, 2009). O bloqueio de genes envolvidos na síntese do LPS, principal antígeno de superfície, obtido pela inserção de transposon, também levou a atenuação da virulência dos mutantes obtidos (MURRAY *et al.*, 2010). Mais recentemente, foi publicada a caracterização de mais um mutante obtido por mutagênese randômica, demonstrando que o gene da chaperona ClpB é essencial para o crescimento de *L. interrogans* tanto em condições de stress oxidativo, escassez de nutrientes, como em temperaturas de cultivo elevadas para 37°C, além de ser importante para a virulência (LOURDAULT *et al.*, 2011).

Apesar de na última década terem ocorridos avanços importantes na aplicação de técnicas moleculares para o estudo da leptospira, novos desafios ainda são apresentados. A identificação e compreensão dos fatores que dificultam a modificação genética de leptospiros patogênicos são importantes para aprimorar os métodos de mutagênese para estas bactérias. Possíveis fatores como especificidade da maquinaria de recombinação, restrição do DNA e sistemas de modificação diferente entre saprófitas e patogênicos, podem estar envolvidos na dificuldade de transformar leptospiros patogênicos (BOURHY *et al.*, 2005). A geração de mutantes é uma estratégia essencial para avaliação funcional de genes. O aprimoramento das técnicas envolvidas neste sistema é outro desafio para o avanço do entendimento da biologia da leptospira e os fatores associados a sua

virulência. A análise em larga escala de mutantes obtidos por mutação randômica como realizado por Murray e cols, em 2009, é um desdobramento importante desta abordagem, porém muito laboriosa e de alto custo. Novas técnicas de triagem da biblioteca de mutantes devem ser desenvolvidas para alcançar mais rapidamente o entendimento de maior número de genes. Uma alternativa é a utilização da técnica de “signature-tagged mutagenesis” (ADLER *et al.*, 2011), que é baseada na identificação por seleção negativa de mutantes atenuados. Esta abordagem já foi aplicada para identificação de fatores de virulência em outras bactérias (SAENZ & DEHIO, 2005). O alcance de respostas para estas duas demandas apresentadas pode contribuir no avanço para o entendimento da patogênese da leptospirose.

8. Conclusões

Este trabalho tem como destaque as seguintes contribuições: o desenvolvimento e aplicação de ferramentas moleculares capazes de modificar geneticamente leptospiros patogênicas por mutagênese randômica e por mutagênese direcionada; a descrição do sistema de expressão heteróloga em *L. biflexa*, que pode servir para avaliação de genes de leptospiros patogênicas; a demonstração que a proteína Loa22 possui papel essencial na virulência da *L. interrogans*, sendo esta a primeira descrição de um fator de virulência de uma leptospiros; a demonstração de que LigB atua como uma adesina, porém isoladamente não é fundamental para a virulência da *L. interrogans*.

9. Referências Bibliográficas

ADLER, B.; FAINE, S. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* Serovar pomona. **Infection and Immunity**, v. 14, n. 3, p. 703-708, 1976.

ADLER, B.; FAINE, S. The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 387-400, 1978.

ADLER, B.; LO, M.; SEEMANN, T. *et al.* Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. **Veterinary Microbiology**, 2011.

ANDRADE, L.; CLETO, S.; SEGURO, A. C. Door-to-dialysis time and daily hemodialysis in patients with leptospirosis: impact on mortality. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN**, v. 2, n. 4, p. 739-744, 2007.

ATHANAZIO, D. A.; SILVA, E. F.; SANTOS, C. S. *et al.* *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**, v. 105, n. 2, p. 176-180, 2008.

BARBOSA, A.S.; MONARIS, D.; SILVA, L. B., *et al.* Functional Characterization of LcpA, a Surface-Exposed Protein of *Leptospira* spp. That Binds the Human Complement Regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 7, p. 3207-3216, 2010.

BARIL, C.; RICHAUD, C.; FOURNIÉ, E. *et al.* Cloning of *dapD*, *aroD* and *asd* of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae, and nucleotide sequence of the *asd* gene. **Journal of General Microbiology**, v. 138, n. 1, p. 47-53, 1992.

BAROCCHI, M. A.; KO, A.I.; REIS, M. G. *et al.* Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6926-6932, 2002.

BECK, M.; MALMSTRÖM, J. A.; LANGE, V. *et al.* Visual proteomics of the human pathogen *Leptospira interrogans*. **Nature Methods**, v. 6, n. 11, p. 817-823, 2009.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N. *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BOURHY, P.; LOUVEL, H.; GIRON, S. I. *et al.* Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a mariner transposon. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 9, p. 3255-3258, 2005.

BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P. *et al.* 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.

- CERQUEIRA, G. M.; MCBRIDE, A. J. A.; PICARDEAU, M. *et al.* Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of LigB to typing leptospiral isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 1173-1181, 2009.
- CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CRODA, J. *et al.* The multifunctional LigB adhesin binds homeostatic proteins with potential roles in cutaneous infection by pathogenic *Leptospira interrogans*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16879, 2011.
- CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L. *et al.* Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2441-2450, 2007.
- CINCO, M. New insights into the pathogenicity of leptospire: evasion of host defences. **The New Microbiologica**, v. 33, n. 4, p. 283-292, 2010.
- COSSART, P.; SANSONETTI, P. J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 242-248, 2004.
- CRODA, J.; RAMOS, J.G.R.; MATSUNAGA, J. *et al.* Leptospira Immunoglobulin-Like Proteins as a Serodiagnostic Marker for Acute Leptospirosis. **Journal Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p.1528-1534, 2007.
- CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J. *et al.* Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 4853-4863, 2005.
- ESHGHI, A.; CULLEN, P. A.; COWEN, L. *et al.* Global proteome analysis of *Leptospira interrogans*. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 10, p. 4564-4578, 2009.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. *et al.* **Leptospira and Leptospirosis**. 2. ed. Melbourne, Australia: MedSci, 2000.
- FAISAL, S. M.; YAN, W.; MCDONOUGH, S. P. *et al.* Leptospira immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. **Vaccine**, v. 27, n. 3, p. 378-387, 2009.
- DE FOST, M.; HARTSKEERL, R. A.; GROENENDIJK, M. R. *et al.* Interleukin 12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with *Leptospira interrogans*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 2, p. 332-335, 2003.
- FRAGA, T. R.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, n. 5, p. 408-419, 2011.

GIRONS, I.S.; MARGARITA, D.; AMOURIAUX, P. *et al.* First isolation of bacteriophages for a spirochaete: potential genetic tools for *Leptospira*. **Research in Microbiology**, v. 141, n. 9, p. 1131-1138, 1990.

GIRONS, I.S.; BOURHY, P; OTTONE, C. *et al.* The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* shuttle vector. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 20, p. 5700-5705, 2000.

GUO, Y.J.; WANG, K.Y.; SUN, S.H. Identification of an HLA-A*0201-restricted CD8(+) T-cell epitope encoded within Leptospiral immunoglobulin-like protein A. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 5, p. 364-373, 2010.

HAAKE, D. A.; LOVETT, M. A. Interjunctional invasion of endothelial cell monolayers. **Methods in Enzymology**, v. 236, p. 447-463, 1994.

HAMBURGER, Z. A.; BROWN, M. S.; ISBERG, R. R. *et al.* Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. **Science**, v. 286, n. 5438, p. 291-295, 1999.

HAUK, P.; MACEDO, F.; ROMERO, E. C. *et al.* 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. 2642-2650, 2008.

INADA, R.; IDO, Y.; HOKI, R. *et al.* The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 23, n. 3, p. 377-402, 1916.

ITO, T.; YANAGAWA, R. Leptospiral attachment to extracellular matrix of mouse fibroblast (L929) cells. **Veterinary Microbiology**, v. 15, n. 1-2, p. 89-96, 1987.

JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G. Antileptospiral activity of serum. II. Leptospiral virulence factor. **Journal of Bacteriology**, v. 93, n. 2, p. 513-519, 1967.

JOHNSON, R. C.; MUSCHEL, L. H. Antileptospiral activity of serum. I. Normal and immune serum. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 4, p. 1403-1409, 1966.

KATZ, A. R.; ANSDELL, V. E.; EFFLER, P. V. *et al.* Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 11, p. 1834-1841, 2001.

KLIMPEL, G. R.; MATTHIAS, M. A.; VINETZ, J. M. *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells: preferential expansion of TCR gamma delta+ T cells vs TCR alpha beta+ T cells. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 3, p. 1447-1455, 2003.

KO, A.I.; REIS, M.G.; DOURADO, C.M.R. *et al.* Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820-825, 1999.

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.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 226, n. 2, p. 215-219, 2003.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, n. 11-12, p. 1545-1552, 2004.

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

LI, L.; OJCIUS, D. M.; YAN, J. Comparison of invasion of fibroblasts and macrophages by high- and low-virulence *Leptospira* strains: colonization of the host-cell nucleus and induction of necrosis by the virulent strain. **Archives of Microbiology**, v. 188, n. 6, p. 591-598, 2007.

LIAO, S.; SUN, A.; OJCIUS, D. M. *et al.* Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 253, 2009.

LIN, Y.P.; LEE, D.W.; MCDONOUGH, S. P. *et al.* Repeated domains of leptospira immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 29, p. 19380-19391, 2009.

LIN, Y.P.; MCDONOUGH, S. P.; SHARMA, Y. *et al.* *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen α C domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1063-1076, 2011.

LOURDAULT, K.; AVIAT, F.; PICARDEAU, M. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. Pt 5, p. 648-655, 2009.

LOURDAULT, K.; CERQUEIRA, G.; WUNDER, E. A.Jr. *et al.* Inactivation of *clpB* in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 9, p. 3711-3717, 2011.

LOUVEL, H.; PICARDEAU, M. Genetic manipulation of *Leptospira biflexa*. **Current Protocols in Microbiology**. 2007. Chapter 12, p. unit 12E.4.

LOUVEL, H.; GIRONS, S. I.; PICARDEAU, M. Isolation and characterization of FecA- and FeoB-mediated iron acquisition systems of the spirochete *Leptospira biflexa* by random insertional mutagenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 9, p. 3249-3254, 2005.

LUO, Y.; FREY, E. A.; PFUETZNER, R. A. *et al.* Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. **Nature**, v. 405, n. 6790, p. 1073-1077, 2000.

MARTIN, P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75 -81, 1997.

MARTINEZ-LOPEZ, D. G.; FAHEY, M.; COBURN, J. Responses of human endothelial cells to pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. e918, 2010.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; *et al.* Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 929-945, 2003.

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

MATSUNAGA, J.; MEDEIROS, M. A.; SANCHEZ, Y. *et al.* Osmotic regulation of expression of two extracellular matrix-binding proteins and a haemolysin of *Leptospira interrogans*: differential effects on LigA and Sph2 extracellular release. **Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 3390-3398, 2007.

MCBRIDE, A. J. A.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G. *et al.* Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 376-386, 2005.

MCBRIDE, A. J. A.; CERQUEIRA, G. M.; SUCHARD, M. A. *et al.* Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 196-205, 2009.

MEDEIROS, A. M.; REIS, M.G.; SILVA, E.F. *et al.* **Proteínas LigA e LigB (Leptospiral Ig-like (Lig) domains) para vacinação e diagnóstico.** 2005. PI0505529-6. (Patente).

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 729-738, 1997.

MERIEN, F.; TRUCCOLO, J.; BARANTON, G. *et al.* Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **FEMS Microbiology Letters**, v. 185, n. 1, p. 17-22, 2000.

MORGAN, J.; BORNSTEIN, S. L.; KARPATI, A. M. *et al.* Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 12, p. 1593-1599, 2002.

- MURRAY, G. L.; ELLIS, K. M.; LO, M. *et al.* *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 7, p. 791-797, 2008.
- MURRAY, G. L.; MOREL, V.; CERQUEIRA, G. M. *et al.* Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 2, p. 810-816, 2009.
- MURRAY, G. L.; SRIKRAM, A.; HENRY, R. *et al.* Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 701-709, 2010.
- NAIMAN, B. M.; BLUMERMAN, S.; ALT, D. *et al.* Evaluation of Type 1 Immune Response in Naïve and Vaccinated Animals following Challenge with *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo: Involvement of WC1+ $\gamma\delta$ and CD4 T Cells. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6147-6157, 2002.
- NALLY, J. E.; WHITELEGGE, J. P.; BASSILIAN, S. *et al.* Characterization of the Outer Membrane Proteome of *Leptospira interrogans* Expressed during Acute Lethal Infection. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 766-773, 2007.
- NASCIMENTO, A. L. T. O.; KO, A. I.; MARTINS, E. A. L. *et al.* 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.
- PALANIAPPAN, R. U. M.; CHANG, Y.F.; JUSUF, S. S. D. *et al.* Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 5924-5930, 2002.
- PALANIAPPAN, R. U. M.; CHANG, Y.F.; HASSAN, F. *et al.* Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 975-984, 2004.
- PALANIAPPAN, R. U. M.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J. *et al.* Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 3, p. 1745-1750, 2006.
- PATARAKUL, K. ;LO, M.; ADLER, B. Global transcriptomic response of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni upon exposure to serum. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 31, 2010.
- PATTI, J. M.; ALLEN, B. L.; MCGAVIN, M. J. *et al.* MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, p. 585-617, 1994.

PEREIRA, M. M.; ANDRADE, J. Human leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil--a serological and epidemiological study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 47-52, 1990.

PICARDEAU, M.; BRENOT, A.; GIRONS, S. I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 189-199, 2001.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C. *et al.* 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. e1607, 2008.

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

PLASTERK, R. H.; IZSVÁK, Z.; IVICS, Z. Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. **Trends in Genetics: TIG**, v. 15, n. 8, p. 326-332, 1999.

QUE-GEWIRTH, N. L. S.; RIBEIRO, A. A.; KALB, S. R. *et al.* A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 24, p. 25420-25429, 2004.

REN, S.X.; FU, G.; JIANG, X.G. *et al.* Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 888-893, 2003.

SAENZ, H. L.; DEHIO, C. Signature-tagged mutagenesis: technical advances in a negative selection method for virulence gene identification. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 612-619, 2005.

SHARMA, S.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P. *et al.* Seroprevalence of leptospirosis among high-risk population of Andaman Islands, India. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 2, p. 278-283, 2006.

SILVA, E.F; MEDEIROS, M. A. MCBRIDE, A. J. A. *et al.* The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6277-6286, 2007.

SILVA, E. F; SANTOS, C. S. ATHANAZIO, D. A; *et al.* Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**, v. 26, n. 31, p. 3892-3896, 2008.

SMITH, D. J.; SELF, H. R. Observations on the survival of *Leptospira australis* A in soil and water. **The Journal of Hygiene**, v. 53, n. 4, p. 436-444, 1955.

SOUZA, V. M.; ARSKY, M. L.; CASTRO, A. P. *et al.* Years of potential life lost and hospitalization costs associated with leptospirosis in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, n. 6, p. 1001-1008, 2011.

STAMM, L. V.; PARRISH, E. A.; GHERARDINI, F. C. Cloning of the recA gene from a free-living leptospire and distribution of RecA-like protein among spirochetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 183-189, 1991.

STERN, E. J.; GALLOWAY, R.; SHADOMY, S. V. *et al.* Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 843-849, 2010.

STEVENSON, B.; CHOY, H. A.; PINNE, M. *et al.* *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. **PloS One**, v. 2, n. 11, p. e1188, 2007.

TANGKANAKUL, W.; THARMAPHORNPIL, P.; PLIKAYTIS, B. D. *et al.* Risk factors associated with leptospirosis in northeastern Thailand, 1998. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 3-4, p. 204-208, 2000.

TENG, C.H.; XIE, Y.; SHIN, S. *et al.* Effects of ompA deletion on expression of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* K1 strain RS218 and on the association of *E. coli* with human brain microvascular endothelial cells. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 10, p. 5609-5616, 2006.

THOMAS, D. D.; HIGBIE, L. M. In vitro association of leptospires with host cells. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 3, p. 581-585, 1990.

TREVEJO, R. T.; RIGAU-PÉREZ, J. G.; ASHFORD, D. A. *et al.* Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 5, p. 1457-1463, 1998.

TUCUNDUVA, F.M.; ATHANAZIO, D A; RAMOS, G. A. E. *et al.* Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 4, p. 231-238, 2007.

UNITED NATIONS. The challenge of slums: global report on human settlements. Nairobi: UN-Habitat, 2003.

VAN DEN INGH, T. S.; HARTMAN, E. G. Pathology of acute *Leptospira interrogans* serotype icterohaemorrhagiae infection in the Syrian hamster. **Veterinary Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 367-376, 1986.

- VERMA, A.; HELIWAGE, J.; ARTIUSHIN, S. *et al.* LfhA, a Novel Factor H-Binding Protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 5, p. 2659-2666, 2006.
- VIEIRA, M. L.; PIMENTA, D. C.; MORAIS, Z.M. *et al.* Proteome Analysis of *Leptospira interrogans* Virulent Strain. **The Open Microbiology Journal**, v. 3, p. 69-74, 2009.
- VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 4, p. 557-569, 2008.
- WANG, B.; SULLIVAN, J.; SULLIVAN, G. W. *et al.* Interaction of leptospire with human polymorphonuclear neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 44, n. 2, p. 459-464, 1984a.
- WANG, B.; SULLIVAN, J. A.; SULLIVAN, G. W. *et al.* Role of specific antibody in interaction of leptospire with human monocytes and monocyte-derived macrophages. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 3, p. 809-813, 1984b.
- WERTS, C; TAPPING, R. I. MATHISON, J. C. *et al.* Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nature Immunology**, v. 2, n. 4, p. 346-352, 2001.
- WOOSTER, D. G.; MARUVADA, R.; BLOM, A. M.; PRASADARAO, N. V. Logarithmic phase *Escherichia coli* K1 efficiently avoids serum killing by promoting C4bp-mediated C3b and C4b degradation. **Immunology**, v. 117, n. 4, p. 482-493, 2006.
- WHO. Leptospirosis worldwide, 1999. **Weekly Epidemiological Record**, v. 74, p. 237-242, 1999.
- WHO. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**, 2003.
- XUE, F.; YAN, J.; PICARDEAU, M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 3, p. 328-333, 2009.
- YANG, H.L.; ZHU, Y.Z.; QIN, J.H. *et al.* In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against *Leptospira interrogans*. **BMC Genomics**, v. 7, p. 293, 2006.
- YELTON, D. B.; COHEN, R. A. Analysis of cloned DNA from *Leptospira biflexa* serovar patoc which complements a deletion of the *Escherichia coli* trpE gene. **Journal of Bacteriology**, v. 165, n. 1, p. 41-46, 1986.

7. Anexo

An imprint method for detecting leptospire in the hamster model of vaccine mediated immunity for leptospirosis

Adenizar D. Chagas-Junior ¹, Alan J. A. McBride ¹, Daniel A. Athanzio ^{1,2},
Cláudio P. Figueira¹, Marco A. Medeiros³, Mitermayer G. Reis¹,
Albert I. Ko^{1,4} and Flávia W. C. McBride^{1,2}

1- Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Salvador, BA, Brazil

2- Department of Biointeraction, Health Sciences Institute, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil

3- Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

4- Division of Infectious Diseases, Weill Medical College of Cornell University, NY, USA