

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola



Dissertação

Caracterização de *Leptospira* spp. quanto à presença e conservação dos genes da família *lig*: alvos potenciais para utilização em vacina e testes de diagnóstico

Gustavo Maia de Cerqueira

GUSTAVO MAIA DE CERQUEIRA

Caracterização de *Leptospira* spp. quanto à presença e conservação dos genes da família *lig*: importantes alvos para utilização em vacina e testes de diagnóstico

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

Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Pelotas, 2006

Banca examinadora:

À minha querida avó materna
À toda minha família
À Deus

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas na figura do Centro de Biotecnologia pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Biomanguiños pelo suporte financeiro ao projeto de pesquisa que resultou nessa dissertação.

Ao Professor Odir Antônio Dellagostin por sua orientação e conduta exemplares, sua amizade e confiança depositada durante a execução deste trabalho, o qual sempre foi um modelo para meu amadurecimento e formação profissional.

Aos demais professores do Centro de Biotecnologia pela amizade e ensinamentos transmitidos.

Ao Dr. Alan J.A. McBride e Dr Albert I. Ko pelo fornecimento de material biológico indispensável à realização deste trabalho e ainda pela oportunidade e ensinamentos transmitidos.

Aos amigos da pós-graduação e colegas do laboratório de Biologia Molecular Ângela Moreira, Daiane D. Hartwig, Éverton F. da Silva, Fabiana K. Seixas, Fabrício R. Conceição, Luciano S. Pinto, Sibeles Borsuk, Simone Simionatto, Vanusa P. da Hora e aos amigos da iniciação científica do mesmo laboratório Michel, Robson, Tessália, Michele. Também aos amigos do laboratório de Biologia celular Andrea, Janaína, Natália, Suse, e aos amigos do laboratório de Imunologia Aplicada, laboratório de Bacteriologia, laboratório de Biopolímeros, laboratório de Reprodução Animal pela amizade, carinho, incentivo e auxílio em todos os momentos.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

CERQUEIRA, Gustavo Maia. **Caracterização de *Leptospira* spp. quanto à presença e conservação dos genes da família *lig*: importantes alvos para utilização em vacina e testes de diagnóstico.** 2006. 52f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

Leptospiras patogênicas carregam um ou mais genes *lig*, os quais codificam para proteínas da família Lig. As proteínas Lig ("*Leptospiral immunoglobulin-like*") são importantes fatores de virulência, e acredita-se que estejam envolvidos na penetração do tecido e na adesão da *Leptospira* às células do tecido hospedeiro. Até o presente momento, as proteínas Lig são apontadas como um dos principais fatores envolvidos na patogênese de *Leptospira* spp. Três genes, *ligA*, *ligB* e *ligC* são conhecidos, os quais codificam para proteínas com o mesmo nome. O interesse pela caracterização dos genes que codificam para as proteínas Lig surgiu pelo fato destas apresentarem potencial imunoprotetor e como antígenos para testes de diagnóstico. Frente a esta constatação, fez-se necessário conhecer o grau de conservação destes genes para inferir se a utilização de uma destas proteínas como antígeno vacinal seria capaz de induzir uma imunidade de amplo espectro. Dentre as espécies patogênicas de *Leptospira*, 4 tiveram seus genes *lig* seqüenciados neste estudo, as quais compreendem *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. weilli* e *L. borgpetersenii*. Entre as proteínas Lig seqüenciadas até o momento, LigB oriunda de *L. interrogans* Copenhageni FIOCRUZ L1-130 aparece como a mais conservada quando comparada com LigB de outras espécies. Com o alinhamento da seqüência dos genes *lig* das diversas espécies, foi possível desenhar *primers* capazes de amplificar por PCR um fragmento interno de cada um dos três genes. Esta abordagem permitiu comprovar a presença do gene *ligB* em todas as espécies patogênicas, enquanto *ligA* aparece apenas em *L. interrogans* e *L. kirschneri*, e *ligC* é encontrado nas espécies *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. weilli* e alguns sorovares de *L. noguchii*. O seqüenciamento do fragmento de *ligB* amplificado por PCR a partir do DNA de 33 sorovares de 6 espécies, e sua análise comparativa juntamente com o fragmento correspondente pertencente aos genes *ligB* depositados no GenBank, possibilitou uma análise filogenética onde verificou-se que é possível diferenciar as espécies pela seqüência deste fragmento.

ABSTRACT

CERQUEIRA, Gustavo Maia. **Characterization of *Leptospira* spp. regarding the presence and conservation of genes belonging to the *lig* family: important targets for vaccines and diagnostic tests.** 2006. 52f. Dissertation (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

Pathogenic *Leptospira* species contain one or more genes of the *lig* family, which code for Lig-family proteins. Lig proteins (“*Leptospiral immunoglobulin-like* proteins”) are considered important virulence factors, and they may be involved in tissue penetration and adhesion to host cells. Lig proteins have been implicated as the main factors involved in pathogenesis of *Leptospira* spp. Three genes, *ligA*, *ligB* and *ligC* are known, which code for proteins with the same name. The increasing interest in the characterization of the genes code for Lig proteins is due to their strong immunoprotective and diagnosis potential. Thus, it was necessary to evaluate the degree of conservation among Lig genes and proteins in order to predict their usefulness as antigens for the induction of a broad range protection. Four of the pathogenic species of *Leptospira* had the *lig* genes sequenced in this study, comprising *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. weilli* and *L. borgpetersenii*. Among the LigB proteins sequenced so far, LigB from *L. interrogans* Copenhageni FIOCRUZ L1-130 appears as the most conserved when compared to LigB from other species. The sequencing and comparative analysis of *lig* genes and proteins demonstrated a low identity among the different genomospecies of *Leptospira* spp. The alignment of *lig* genes sequences from all the genomospecies enabled us to design *primers* that allowed the amplification of a fragment from each gene. Such approach demonstrated that *ligB* gene is present in all the pathogenic species, while *ligA* gene is only found in *L. interrogans* and *L. kirschneri* and *ligC* gene is present in *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. weilli* and some serovars of *L. noguchii*. The sequencing of the amplified fragment, derived from 33 serovars which comprise 6 genomospecies, and their comparative analysis together with the corresponding region from *ligB* sequences available in GenBank, enabled a phylogenetic analysis. It was possible to differentiate pathogenic species based on the DNA sequence of this *ligB* fragment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Caracterização *in silico* dos genes *lig*. p.30.

Figura 2 – Plot demonstrando o nível de conservação ao longo da proteína LigB entre os diferentes sorovares e espécies genômicas, contra LigB de *L. interrogans* Copenhageni FIOCRUZ L1-130. p.33, 34 e 35.

Figura 3 – Localização das regiões mais variáveis dentro da sequência de aminoácidos de LigB. p.35, 36 e 37.

Figura 4 – Detecção dos genes *lig* por PCR em cepas patogênicas. p.38.

Figura 5 – Análise por Southern blot demonstrando a presença dos genes *lig* nas cepas de *L. interrogans* e *L. kirschneri* virulentas. p.41.

Figura 6 – Árvore filogenética montada com base em LigB. p.43 e 44.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Cepas usadas no estudo. p. 20.

TABELA 2 – Conjunto de *primers* usados no estudo. p. 21 e 22.

TABELA 3 – Cepas usadas no seqüenciamento completo dos genes *lig*. p. 27.

TABELA 4 – Genes detectados por PCR e análise comparativa dada pelo seqüenciamento. p. 28.

TABELA 5 – Conservação de LigA no nível de nucleotídeos e aminoácidos entre vários sorovares e espécies. p. 31.

TABELA 6 – Conservação de LigB no nível de nucleotídeos e aminoácidos entre vários sorovares e espécies. p. 32.

TABELA 7 – Conservação de LigC no nível de nucleotídeos e aminoácidos entre vários sorovares e espécies. p. 33.

TABELA 8 – Caracterização da presença ou ausência dos genes *lig* nas diferentes espécies. p. 40.

LISTA DE ABRVIATURAS, NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS

Big	<i>“Bacterial Immunoglobulin-like”</i>
BLAST	<i>“Basic Local Alignment Search Tool”</i>
cm	centímetro(s)
DNA	<i>“Desoxi-ribonucleic acid”</i>
EPEC	<i>“Enteropathogenic E.coli”</i>
kb	kilo par(es) de base(s)
LB	Luria-Bertani
Lig	<i>“Leptospiral Immunoglobulin-like”</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
ml	mililitro(s)
pb	par(es) de base(s)
PCR	<i>“Polymerase Chain Reaction”</i>
rDNA	Gene que codifica para RNA ribossomal
RV	Região variável
Sph	<i>“Sphingomyelinase”</i>
Tir	<i>“Translocated intimin receptor”</i>
µg	micrograma(s)
µl	microlitro(s)
°C	grau(s) Célcus

SUMÁRIO

Caracterização de <i>Leptospira</i> spp. quanto à presença e conservação dos genes da família <i>lig</i> : alvos potenciais para utilização em vacina e testes de diagnóstico.....	1
AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABRVIATURAS, NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Leptospirose.....	12
1.2. Patogênese e papel das proteínas Lig.....	13
1.3. Outros fatores de virulência e elementos envolvidos na patogenia.....	14
1.4. Estudos filogenéticos.....	16
1.5. Potencial das proteínas Lig na vacinologia e diagnóstico.....	16
2. OBJETIVO GERAL.....	18
2.1. Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Cepas usadas no estudo e cultivo.....	19
3.2. Extração de DNA genômico.....	19
3.3. Desenho de <i>primers</i> , amplificação por PCR, clonagem e seqüenciamento.....	19
3.4. Detecção dos genes <i>lig</i> por Southern blot.....	24
3.5. Análise dos genes e alinhamento.....	25
3.6. Análise filogenética.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Seqüenciamento dos genes <i>ligA</i> , <i>ligB</i> e <i>ligC</i> de isolados de <i>Leptospira</i> spp.	27
4.2. Caracterização <i>in silico</i> dos genes e proteínas LigA, LigB e LigC.....	29
4.3. Desenvolvimento de um método de detecção dos genes <i>lig</i> por PCR.....	37
4.4. Análise filogenética.....	42
5. DISCUSSÃO.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leptospirose

Leptospira é um gênero clinicamente importante dentro do grupo das espiroquetas. Esta bactéria é o agente causador da leptospirose, doença que acomete humanos e animais pelo mundo todo e que é transmitida por meio de água ou outros fluídos contaminados (KO *et al.*, 1999). Esta doença é a zoonose mais dispersa no mundo e que aparece como uma das doenças infecciosas emergentes (KO *et al.*, 1999; LEVETT, 2001; McBRIDE *et al.*, 2005).

O principal vetor para o homem é o roedor, o que define a doença como uma antroponose. Além dos roedores, também outros animais e o próprio homem podem ser fontes de transmissão horizontal (LEVETT, 2001). A doença produz como sintomas dores de cabeça, dores musculares (principalmente na panturrilha), febre, icterícia, deficiências renal e cardíaca, podendo evoluir, nos casos mais graves, para hemorragia pulmonar e morte. Estes sintomas aproximam-se aos de uma gripe forte, o que dificulta sua identificação inicial e o correto tratamento (KO *et al.*, 1999; LEVETT, 2001).

Com relação à classificação do agente causador de Leptospirose, análises de hibridização DNA-DNA (RAMADASS *et al.*, 1992; BREENER *et al.*, 1999; LEETOCART *et al.*, 1999) subdividiram a espécie patogênica, *Leptospira interrogans*, em diferentes espécies genômicas (FAINE *et al.*, 1999). Na classificação atual, aparecem como as espécies genômicas mais importantes dentro do grupo das patogênicas, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. weilli* e *L. santarosai* (FAINE *et al.*, 1999; HAAKE *et al.*, 2004).

Epidemiologicamente, no Brasil, leptospirose apresenta uma incidência de 1,6 casos para cada 100 mil habitantes. Este dado é do ano de 2004 e aparece associado a eventos como distribuição de chuvas e temperaturas, nível de sanidade básica e pobreza (KO *et al.*, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE / VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2005). Em países de primeiro mundo, por outro lado, a doença está associada com atividades ocupacionais e recreacionais (LEVETT, 2001)

1.2. Patogênese e papel das proteínas Lig

Acredita-se que as proteínas Lig (*“Leptospiral immunoglobulin-like”*) sejam importantes fatores de virulência, os quais estão envolvidos na penetração do tecido assim como na adesão da *Leptospira* às células do tecido hospedeiro. Até o presente momento, as proteínas Lig têm sido pré-supostas como importantes fatores de virulência envolvidos na patogênese de *Leptospira* spp. (MATSUNAGA *et al.*, 2003) por conferirem a esta espiroqueta, a capacidade de penetrar, se disseminar e persistir nos tecidos dos mamíferos hospedeiros, aderindo-se às células eucarióticas e proteínas da matriz extracelular (TSUCHIMOTO *et al.*, 1984; VINH *et al.*, 1984; BALLARD *et al.*, 1986; THOMAS e HIGBIE, 1990). Além disso, acredita-se que as proteínas Lig sejam capazes de conferir às espécies patogênicas a habilidade de rapidamente se translocar através de camadas de células, sem romper as junções intercelulares, como um mecanismo para invadir os órgãos do hospedeiro (BAROCCHI *et al.*, 2002).

Sabe-se que as proteínas Lig são osmoreguladas e expressas *in vivo* no hospedeiro, justamente onde aparecem ser positivamente reguladas (PALANIAPPAN *et al.*, 2002; MATSUNAGA *et al.*, 2005). Porém, *in vitro*, elas são pobremente expressas devido provavelmente à instabilidade protéica ou ao baixo nível de expressão. No nível de transcrição, *ligA* e *ligB*, foram detectadas por RT-PCR, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (PALANIAPPAN *et al.*, 2002; MATSUNAGA *et al.*, 2003). Em ambas as proteínas de *L. interrogans*, LigA e LigB, foi identificada a presença de repetições em “tandem” de domínios Big2. Estes são assim denominados por se assemelharem àqueles presentes nas imunoglobulinas, os quais são compostos por 80-100 aminoácidos (PALANIAPPAN *et al.*, 2002; MATSUNAGA *et al.* 2003; KOIZUMI e WATANABE, 2004). Tal motivo repetido é encontrado em fatores de virulência bacterianos os quais mediam a aderência com a célula hospedeira e a invasão, como no caso de intiminas de *Escherichia coli* (LUO *et al.*, 2000) e invasinas de *Yersinia pseudotuberculosis* (HAMBURGER *et al.*, 1999). Estas importantes bactérias Gram negativas baseiam sua adesão, às células eucarióticas, em proteínas de membrana externa estruturalmente similares às proteínas Lig (FRANKEL *et al.*, 1995).

As análises realizadas sobre as intiminas de *E. coli* e invasinas de *Yersinia* spp. revelaram uma estreita similaridade com os domínios Big2 encontrados em ambas

as proteínas LigA e LigB, com relação à distribuição destes domínios regularmente ao longo de ambas as proteínas e à presença de uma estrutura carboxiterminal em todas as proteínas LigB (FRANKEL *et al.*, 1995; PALANIAPPAN *et al.*, 2002; MATSUNAGA *et al.*, 2003). Ainda em relação à sua estrutura, LigA e LigB compartilham uma região idêntica que compreende os primeiros 719 aminoácidos e vem seguida por uma porção não-idêntica de 596 aminoácidos em LigA e 484 em LigB, respectivamente. Em LigA, a soma de ambas regiões constitui a proteína inteira enquanto LigB apresenta ainda a mencionada cauda carboxiterminal de 779 aminoácidos (MATSUNAGA *et al.*, 2003).

Entre as espécies genômicas de *Leptospira*, 6 espécies são encontradas constituindo um cerne de leptospiros patogênicos (HAAKE *et al.*, 2004). Dentre estas, todas demonstram a presença do gene *ligB* (MATSUNAGA *et al.*, 2003).

Outra proteína presente em cepas patogênicas do gênero *Leptospira* é a proteína LigC. Esta também apresenta estrutura composta por domínios Big2 semelhante às proteínas LigA e LigB e um domínio carboxiterminal como aquele presente na proteína LigB (MATSUNAGA *et al.*, 2003).

Um aspecto intrigante é o fato de o gene *ligC* ser um pseudogene em *L. interrogans* Copenhageni Fiocruz L1-130 e *L. kirschneri* Grippotyphosa RM52. Porém, nos sorovares Lai 56601 e Pomona Kennewicki de *L. interrogans*, este gene codifica a proteína LigC integralmente (MATSUNAGA *et al.*, 2003).

Até o momento, LigC foi identificada apenas em cepas das espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri* e em função de sua estrutura semelhante às adesinas já mencionadas, tanto de *Leptospira* quanto de outras bactérias Gram negativas, especula-se sua possível participação na patogênese deste gênero, ao lado das outras proteínas Lig (MATSUNAGA *et al.*, 2003).

1.3. Outros fatores de virulência e elementos envolvidos na patogenia

A grande variedade de células hospedeiras reconhecidas pelas leptospiros sugere a presença de diversas adesinas nesta espiroqueta. Estas adesinas atuam supostamente como fatores de virulência, os quais se ligam à fibronectina purificada (MERIEN *et al.*, 1997).

Outras proteínas expostas na superfície estão provavelmente envolvidas na adesão de *Leptospira* spp. às células hospedeiras. Assim como outras espiroquetas,

Leptospira spp. tem um vasto repertório de lipoproteínas (GUERREIRO *et al.*, 2001; CULLEN *et al.*, 2002; CULLEN *et al.*, 2004; CULLEN *et al.*, 2005), as quais vêm sendo testadas para o desenvolvimento de vacinas como uma tentativa de impedir o estabelecimento da doença. Anteriormente, a proteína integral de membrana OmpL1, as lipoproteínas LipL41 e LipL32, proteína periférica de membrana P₃₁LipL45 e outros alvos foram testados para essa mesma finalidade demonstrando sua participação na patogênese (HAAKE *et al.*, 1993; SHANG *et al.*, 1996; BARNETT *et al.*, 1999; HAAKE, 2000; GAMBERINI *et al.*, 2005).

Recentemente, o seqüenciamento do genoma de 2 sorovares de *L. interrogans* revelou a existência de outros alvos potenciais para o desenvolvimento de novas estratégias vacinais (GAMBERINI *et al.*, 2005). A análise comparativa dos dois genomas demonstrou seu alto grau de similaridade, o que reforça a possibilidade de uma vacina comum a todos os sorovares de *Leptospira* spp. (NASCIMENTO *et al.*, 2004).

Outros elementos foram vistos contribuindo para a virulência desta espiroqueta, como o flagelo periplasmático, o qual está envolvido no movimento propulsor, penetração ativa do tecido e mobilidade através de fluidos altamente viscosos (GREENBERG e PAROLA 1977; TOWERS *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2004); quimiotaxia, uma vez que *Leptospira* demonstrou ser atraída por superfícies danificadas da pele (YURI *et al.*, 1993); hemolisinas, uma vez que elas secretam esfingomielinase C (SphA) e hemolisinas formadoras de poros (SphH); e o próprio lipopolisacarídeo (LPS), o qual é o determinante antigênico principal deste gênero (FAINE *et al.*, 1999).

Ainda não está claro se as diferentes espécies de *Leptospira* spp. necessitam do elemento Tir ("Translocated intimin receptor"), assim como outras bactérias Gram negativas como *Escherichia coli* EPEC, para a aderência à superfície da célula hospedeira, por meios de suas adesinas. O elemento Tir é codificado pela própria bactéria, incorporando-se na membrana da célula hospedeira ao mesmo tempo que se expõe para o exterior (NOGAYRÈDE *et al.*, 2003). Uma vez posicionado na membrana torna-se o domínio ao qual as adesinas se ligarão. Tal elemento parece ser de grande importância na virulência e sua ausência resultaria na perda de patogenicidade de *E. coli*. Alternativamente outras rotas podem estar envolvidas na adesão, não requerendo assim a presença de Tir (NOGAYRÈDE *et al.*, 2003).

1.4. Estudos filogenéticos

O estudo da diversidade genética das adesinas de bactérias Gram negativas resultou em informações de grande valia para o desenvolvimento de vacinas e estudos de evolução molecular (TARR e WHITTAM, 2002; ZHANG *et al.*, 2002; TOWERS *et al.*, 2003). A recente publicação da seqüência do genoma de dois sorovares de *L. interrogans* revelou características peculiares, como por exemplo, a inversão de uma grande região correspondente entre o genoma de Lai e Copenhageni e a alta identidade entre os genes que codificam para a rota de síntese do LPS com os de *E. coli*, que demonstram ter sido provavelmente adquiridos por eventos de transferência gênica horizontal (Ren *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004).

O estudo da diversidade genética de *Leptospira* spp. pode auxiliar na elaboração de vacinas mais eficazes, considerando o alto número de sorovares existentes para as diversas espécies. Análises filogenéticas com base nas seqüências das regiões codificadoras das lipoproteínas *ompL1*, *lipL41* e *lipL32* tentaram correlacionar os diversos sorovares em função do grau de similaridade que há entre as seqüências codificadoras desses alvos vacinais, como uma medida para o desenvolvimento de vacinas de amplo espectro (HAAKE *et al.*, 2004).

1.5. Potencial das proteínas Lig na vacinologia e diagnóstico

O diagnóstico molecular mediante a amplificação por PCR das regiões codificadoras dos genes *lig* foi testado, tanto por PCR convencional quanto por *real-time PCR*, e em ambos os casos a detecção de leptospiros em estágio inicial de infecção foi bem sucedida (PALANIAPPAN *et al.*, 2005).

No campo da medicina preventiva, vacinas do tipo bacterinas estão disponíveis. Porém, estas apresentam imunidade pouco duradoura e são sorovar-específicas, o que vem a se tornar problemático uma vez que *Leptospira* spp. apresenta-se constituída por mais de 250 sorovares e assim diversas formulações vacinais seriam necessárias para se alcançar uma proteção completa (LEVETT, 2001).

As proteínas LigA e LigB já foram avaliadas quanto ao seu potencial na proteção contra o desafio em camundongos (KOIZUMI e WATANABE, 2004) e quanto ao seu uso no imunodiagnóstico (PALANIAPPAN *et al.*, 2004). Em ambos os estudos mostraram-se promissoras para as finalidades desejadas.

Atualmente, novos estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de comprovar o potencial protetor das proteínas Lig mediante o desafio em Hamsters. Interessantemente, a proteína LigA tem demonstrado eficiente proteção no desafio com a cepa homóloga e possibilidade na proteção de amplo espectro (PALANIAPPAN *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, comunicação pessoal).

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi caracterizar os genes *lig* quanto ao polimorfismo da sequência de DNA e quanto a presença ou ausência em sorovares patogênicos de *Leptospira* spp, com o propósito de subsidiar estudos que visam a utilização destes antígenos como vacina de amplo espectro, bem como possibilitar a realização de estudos filogenéticos deste importante gênero de bactérias.

2.1. Objetivos específicos

- Seqüenciar os genes *ligA*, *ligB* e *ligC* de sorovares das espécies *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. weilli* e *L. borgpetersenii* e alinhar as seqüências geradas com aquelas depositadas no GenBank, tanto em nível de nucleotídeos quanto de aminoácidos, para avaliar sua conservação.
- Desenvolver um método baseado em PCR para identificar a presença dos genes *lig* nas diferentes espécies de *Leptospira*, por meio da amplificação de um fragmento interno aos respectivos genes.
- Seqüenciar o fragmento interno do gene *ligB*, dos sorovares das espécies patogênicas, e utilizar as seqüências geradas na análise filogenética das espécies genômicas de *Leptospira* spp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cepas usadas no estudo e cultivo

As cepas de *Leptospira* spp. foram cultivadas à 30°C em meio EMJH suplementado com 10% de albumina (Difco). O crescimento e motilidade foram acompanhados por microscopia de campo escuro. Cepas de baixa e alta passagem foram cultivadas. Foram utilizados diferentes sorovares, listados na Tab. 1, os quais cobrem as diversas espécies genômicas. As amostras foram cedidas pelo Dr. Alan J. A. McBride e Dr. Albert I. Ko do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BA) e pelo Dr. David A. Haake (University of California at Berkley).

3.2. Extração de DNA genômico

O DNA genômico das cepas de *Leptospira* spp. foi extraído segundo o protocolo de extração de DNA genômico de bactérias gram negativas do kit “GFX Genomic Blood DNA purification Kit” (Amesham - GE Healthcare). O DNA extraído foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% a fim de avaliar a sua qualidade. O DNA extraído foi mantido a -20°C.

3.3. Desenho de *primers*, amplificação por PCR, clonagem e seqüenciamento

Primers foram desenhados com a finalidade de amplificar e seqüenciar as regiões codificadoras dos genes *lig* na sua totalidade (Tab. 2). Os *primers* usados para o seqüenciamento completo das regiões codificadoras dos genes *lig* foram degenerados com a finalidade de servirem ao seqüenciamento dos genes oriundos das diferentes espécies de leptospira. Para tal fim foi realizado um alinhamento das regiões codificadoras dos genes *lig* disponíveis no GenBank usando o software AlignX (Invitrogen), parte do pacote que contém o software Vector NTi 8.0 (Invitrogen). Todos os *primers* foram construídos e analisados mediante o uso do software Vector NTI 8.0 (Invitrogen).

Tabela 1 - Cepas usadas no estudo

Código	Espécie	Sorogrupos	Sorovar	Cepa/Isolado	Origem/Fonte
Pom	<i>L. interrogans</i>	<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	P10637-46	Suíno/USA
Can	<i>L. interrogans</i>	<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	Kito	Canino/Brasil
Can2	<i>L. interrogans</i>	<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	Mex1	Bovino/México
Nog	<i>L. noguchii</i>	<i>Bataviae</i>	ND	Cascata	Humano/Brasil
-	<i>L. noguchii</i>	<i>Australis</i>	ND	Hook	Canino/Brasil
Har	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Hardjo</i>	ND	USDA	Bovino/USA
Heb	<i>L. weilli</i>	<i>Hebdomadis</i>	ND	Ecochallenge	Humano/USA
Cop	<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Copenhageni</i>	L1130	Humano/USA (NCBI)
Gri	<i>L. kirschneri</i>	<i>Grippotyphosa</i>	<i>Grippotyphosa</i>	RM52	Suíno/USA (NCBI)
Lai	<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Lai	56601	Humano/China (NCBI)
Man	<i>L. interrogans</i>	ND	Manilae	UP-MMC-NIID	Humano/Japão (NCBI)
PomC	<i>L. interrogans</i>	<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Kennewicki	Equine/USA (NCBI)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Autumnalis</i>	<i>Autumnalis</i>	AkiyamiA	Humano/Japão (OMS)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Sejroe</i>	<i>Hardjo</i>	Hardjoprajtino	Humano/Indonésia (OMS)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Pomona</i>	Kennewicki	LT1026	Bovino/USA (OMS)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Australis</i>	Bratislava	Jez Bratislava	Porco-espinho/Rep Tcheca (OMS)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Australis</i>	Muenchen	Muenchen C90	Humano/Alemanha (OMS)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Humano/Austrália (OMS)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	Hond Utrech IV	Canino/Holanda (OMS)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Hebdomadis</i>	<i>Hebdomadis</i>	<i>Hebdomadis</i>	Humano/Japão (OMS)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	RGA	Humano/Bélgica (OMS)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Copenhageni</i>	M20	Humano/Dinamarca (OMS)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Australis</i>	<i>Australis</i>	Ballico	Humano/Austrália (OMS)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Bataviae</i>	<i>Bataviae</i>	Van Tienem	Humano/Indonésia (OMS)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Sejroe</i>	Wolffi	3705	Humano/Indonésia (OMS)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Lai	Lai	Humano/China (OMS)
-	<i>L. interrogans</i>	<i>Pyrogenes</i>	Manilae	LT398	Rato/Filipinas (OMS)
-	<i>L. kirschneri</i>	<i>Australis</i>	Ramisi	Musa	Humano/Quênia (OMS)
-	<i>L. kirschneri</i>	<i>Bataviae</i>	Djatzi	HS26	Humano/Porto Rico (OMS)
-	<i>L. kirschneri</i>	<i>Pomona</i>	Mozdok	5621	Veado/Rússia (OMS)
-	<i>L. kirschneri</i>	<i>Autumnalis</i>	<i>Erinaceauriti</i>	EA670	Porco-espinho/Rússia (OMS)
-	<i>L. kirschneri</i>	<i>Hebdomadis</i>	Kambale	Kambale	Humano/Zaire (OMS)
-	<i>L. noguchii</i>	<i>Louisiana</i>	Orleans	LSU2580	Nutria/USA (OMS)
-	<i>L. noguchii</i>	<i>Panama</i>	Panama	CZ214K	Opossum/Panama (OMS)
-	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Mini</i>	Mini	Sari	(OMS)
-	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Tarassovi</i>	<i>Tarassovi</i>	Perepelicin	(OMS)
-	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Javanica</i>	Poi	Poi	(OMS)
-	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Javanica</i>	<i>Ceylonica</i>	Piyasena	Humano/Sri Lanka (OMS)
-	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Javanica</i>	<i>Javanica</i>	Veldrat Batavia 46	(OMS)
-	<i>L. weilli</i>	<i>Celledoni</i>	<i>Celledoni</i>	<i>Celledoni</i>	Humano/Austrália (OMS)
-	<i>L. weilli</i>	<i>Tarassovi</i>	Vughia	LT89-68	Humano/Vietnam (OMS)
-	<i>L. santarosai</i>	<i>Sejroe</i>	Trinidad	TRVL34056	Humano/Trinidade (OMS)
-	<i>L. santarosai</i>	<i>Pyrogenes</i>	Alexi	HS616	Humano/Porto Rico (OMS)
-	<i>L. fainei</i>	<i>Hurstbridge</i>	<i>Hurstbridge</i>	But6	Suíno/Austrália (OMS)
-	<i>L. meyeri</i>	<i>Semarang</i>	<i>Semarang</i>	Veldrat 173	Rato/USA (OMS)
-	<i>L. biflexa</i>	<i>Semarang</i>	Patoc	Patoc1	Água/Itália (OMS)

ND - Informação não disponível

Tabela 2 - Conjunto de primers usados no estudo

Primers para clonagem dos genes <i>lig</i> inteiros	
<i>lig</i> AF	5'CAATTAAAGATCGTTATACGATAC3'
<i>lig</i> AR	5'AAGAAGAAACGATCACAAGGTC3'
<i>lig</i> BF	5'CTTTATTACGAATTCATTGAGTTATTT3'
<i>lig</i> BR	5'TTATTGATTCTGTTGTCTGTAAATTTTG3'
<i>lig</i> CF	5'GTCTTCATTTAGGATTTTATAA3'
<i>lig</i> CR	5'TAACATTCTACCTCCAAGGT3'
<i>lig</i> BAF	5'CAAAGTTGTATGTCTTGCCACT3'
<i>lig</i> BAR	5'GGTCTAGATGCATATTATTGATTCTGTTGTCTG3'
Primers para sequenciamento dos genes <i>lig</i>	
<i>lig</i> A forward primers	
ID A F-2000	5'TTCTGTAGATTTTACCGTCACAC3'
<i>lig</i> A F-2500	5'(G/A)(A/G)(A/G)TATTAA(A/G)GCGACATTGGG3'
<i>lig</i> A F-3000	5'C(T/G)(G/A)ATCCGAA(T/A)(G/A)T(T/C)GCATC3'
<i>lig</i> A F-3500	5'C(G/T)GA(T/A)CTTGT(G/A)AC(C/T)TGGA(A/G)(G/T)TC(C/T)TC3'
<i>lig</i> A reverse primers	
<i>lig</i> A R-3500	5'(A/G)GAGGAACCTAC(A/G)GAAAG(C/A)G3'
<i>lig</i> A R-3000	5'TGTT(T/A)TC(T/G)A(C/T)(T/C)GATGC(G/A)A(T/C)(T/A)TTC3'
<i>lig</i> A R-2500	5'CTTACATTTCCAATGTCGC3'
<i>lig</i> A R-2000	5'CCTGTGTGACGGTAAATCTAC3'
<i>lig</i> A R-1500	5'AGAAGGATTTACAGGATTGATTTG3'
<i>lig</i> B R-1000	5'G(G/A)T(C/T)(G/C/T)GT(A/G)ATATC(C/T)(G/A)A(G/A)TT(T/C)G3'
<i>lig</i> B R-500	5'GGA(A/G)GACCAAA(C/T)(G/C)(A/G)TCA(G/A)TG3'
<i>lig</i> B forward primers	
ID F-500	5'CCA ^T TGATCGTTTGGTC(T/C)TCCAG3'
ID F-1000	5'CGGATAT(T/C)AC(C/G/A)(G/A)A(C/T)CA(A/G)GTTAC3'
ID F-1500	5'TTACGGCTA(C/G)(T/G)GG(G/A)ATCTACTC3'
ID F-2000	5'TTGC(C/G/A)GTAAC(A/G)CC(T/G)A(T/C/G)(A/T)AATCC3'
<i>lig</i> B F-2500	5' ^C CC(A/G)ATT(C/T)CGAT(T/C/G)AC(A/G)GT(C/T)AC3'
<i>lig</i> B F-2980	5'AA ^C CAAGGGAAAAGCGACCGC3'
<i>lig</i> B F-3500	5'A ^T ICC ^A AATTCTCAAACC(G/A)(C/G)AG3'
<i>lig</i> B F-4000	5'ACGGAGACGG(C/A)TTTGACAAC3'
<i>lig</i> B F-4500	5'G ^C TT ^{CA} A(C/T)TATCTCTATTA(T/C)TC(C/T)TC3'
<i>lig</i> B F-5000	5'CC ^A AATTC(A/C)(C/T)TACATAATGGAAG3'

Tabela 2 - Continuação

<i>lig</i> B reverse primers	
<i>lig</i> B R-5500	5'TCCGTTTTCGTT(A/G)TCAAAACC3'
<i>lig</i> B R-5000	5'TTATGTA(G/A)(T/G)GAATT ^I GGAAATCC(T/C)C3'
<i>lig</i> B R-4500	5'(C/T) ^I GAGGA(A/G)TAATAGAGATA(G/A)T(C/T)(G/C)AA(T/G)C3'
<i>lig</i> B R-4000	5'GTCAAA(G/T)CCGTCTCCGT(T/C)C3'
<i>lig</i> B R-3500	5' ^{AA} TTGAA(G/A)TCCG(T/C)(A/G)TTATC(T/C/G)(G/A)AAC3'
<i>lig</i> B R-2980	5'CGGTCGCTTTCCCTTG3'
<i>lig</i> B R-2500	5'GT(A/G/C)ATCG(G/A)AAT(T/C)GG(G/A)GA(G/A)C3'
<i>lig</i> B R-2000	5'GGATT(T/A)(A/G/C)T(A/C)GG(T/C)GTTAC(G/T/C)GCAA3'
<i>lig</i> B R-1500	5'TAGC ^C G(T/A)AAA(T/G) ^I TTT(G/T)(A/C)(G/T)TTAA(C/G)C3'
<i>lig</i> B R-1000	5'G(G/A)T(C/T)(G/C/T)GT(A/G)ATATC(C/T)(G/A)A(G/A)TT(T/C)G3'
<i>lig</i> B R-500	5'GGA(A/G)GACCAAA(C/T)(G/C)(A/G)TCA(G/A)TG3'
<i>lig</i> C forward primers	
CF500	5'CGT(C/T)ACATC(C/T)GCTGTTTTGTCCG3'
CF1000	5'GCAACGTTAGCGGAATTAC(C/T)3'
CF1500	5'GAGAAATA(C/T)AATCTCCTTCTCCG3'
CF2000	5'GGATTCTTCCAT(C/T)G(C/T)TTCCGTAGAC3'
CF2500	5'TGCAACCGGAGTTTA(C/T)TC(A/G)GATG3'
CF3000	5'T(C/T)TCTCCAGC(A/G)GACATTAG(C/T)GTA(G/T)CC3'
CF3500	5'GCGACTTTGGGAAGTATCAG(C/T)GGAAAC3'
CF4000	5'GCAGAATGTACCGTTCT(A/G)CAGAATG3'
CF4500	5'GCGACTAACGTAAGTTC(A/T)AACT(C/T)AGCTTC3'
CF5000	5'GCGTT(C/T)GA(C/T)GGAACCAAAGG3'
CF5500	5'GAAG(A/G)GCACAACCTTTGGAATGTGATC3'
<i>lig</i> C reverse primers	
CR5250	5'GAACAAGA(A/G)TC(C/T)GGTCCGGTACAAGC3'
CR4750	5'G(G/T)GTCTGC(A/G)GAGTAATACAGATAATC3'
CR4250	5'AAGAATTTCCGATTGATCCCC3'
CR3750	5'AC(A/G)AACACAGATCCGCTTCCAC3'
CR3250	5'GGCGGC(C/T)GTAACCGT(C/T)AAAC3'
CR2750	5'GTTGAA(A/G)GAAGAGGTGGGAGC3'
CR2250	5'CCAAA(C/T)AACTTG(A/G)TCACTAAT(A/G)TTC3'
CR1750	5'CCT(A/G)TTCGTGTTGGA(A/G)GAATTCC3'
CR1250	5'GT(A/G)CTACC(A/G)AC(C/T)CCGACTCC3'
CR750	5'AAGTG(C/T)T(A/G)CC(A/T)GGAGAAAG(C/T)CC3'

Tabela 2 - Continuação

Primers usados para gene walking	
Lep150	5'CTAATAGCTACGGGAATCTATT3'
Lep151	5'ATAACGTAGAAACCGGACTA3'
Lep152	5'CAAAGGTGAGTAACGCATCT3'
Lep153	5'GGTTTGAGAATTGGAATTGA3'
Lep154	5'CTCCTCGATCAACTGGGGTT3'
Lep155	5'CCTCACAAGGACTAGGATTT3'
Lep156	5'CGGATGGTTCTCATCAGGAT3'
Lep157	5'AGAACCGCAGGAAGTACAGT3'
Lep158	5'CTGGTACCGTTTGCATAGA3'
NBF1	5'CCTATCTCGTCTCACAAGCAAAG3'
NBF2	5'GCGATGGAATCTATACAGATCATT3'
NBF3	5'AGTTAAGCTGTCCGAATAACGCC3'
NBR1	5'CCGAATAAACTCCATACGCGG3'
NBR2	5'GTTGCAAATACTCCTCTTCCGTC3'
JF	5'ATTTGATATATTTTGTTCCTCCG3'
JsignalR	5'GTGGAAGACCCCAACGAA3'
JB1F	5'ATTCGATCCAAGTTACGAGTTTAGAT3'
JB1R	5'TTTCCCAAAGGAAGATTCTGA3'
JB2F	5'CCGTTTTGGCTTCCATCG3'
JB2R	5'ATCGAAACCAAGACGCCTG3'
JB3F	5'TCGGTCACTTGGACTTCTTCTTC3'
JB3R	5'GGAAGTGAATTGTCCGAATAAAT3'
JB4F	5'GGATATTACGGAACAAGTCACTTG3'
JB4R	5'GCAGTGATGTTTGCACTTCCG3'
JB5F	5'GCGTTCGGTGTTTATTCGGA3'
JB5R	5'AAAATTCGCCCTATCTTTCGG3'
lig A KAF	5'AATCTTCCAATACAGCCTACGC3'
lig A KAR	5'CCAAACCAGCTGATCCGAAG3'
lig B ATG F	5'CTCAATAAATAAACACAGCAAATACAC3'
lig B ATG R	5'GTAAGTGGTACCGTTTGCATGA3'
lig B G6 F	5'GGTCACTTGGACTTCTTCTTC3'
lig B G6 R	5'CTTTGCGAGAGTGGTAGTATTCATC3'
lig C ATG F	5'TTATGATAGTTTGCTATTTAGGATGTTA3'
lig C ATG R	5'TCTAACTCTGTCTCGGATGGTTC3'
lig C G1 F	5'TCAATCTTCTATCGCAGGTGTAAAC3'
lig C G1 R	5'CTTGGGTTTGCAGGAGTGAT3'
lig C G2 F	5'GTAGCCAAAGGAAACAGCAAGG3'
lig C G2 R	5'AAACAGTAATCACAGAAGAGGTAGAAG3'

Tabela 2 - Continuação

Primers para detecção por PCR	
PSAF	5'C(G/T)GA(AT)CTTGT(A/G)AC(C/T)TGGA(A/G)(G/T)TC(C/T)TC3'
PSAR	5'TTGTTAATGTTTTCAT(A/G)TTA(C/T)GGC3'
PSBF	5'CGGGATCCAAGGTAAGTCCGGCACAATTGATTTCCA3'
PSBR	5'GT(A/G/C)ATCG(G/A)AAT(T/C)GG(G/A)GA(G/A)C3'
PSB2F	5'GGATATTACGGAACAAGTCACTTG3'
PSB2R	5'CCGAATAAACTCCATACGCGG3'
PSCF	5'GAGAAATA(C/T)AATCTCCTTCTTCCGG3'
PSCR	5'CCT(A/G)TTCGTGTTGGA(A/G)GAATTCC3'
Primers para amplificação dos controles internos	
lip L32F	5'CGCTTGTGGTGCTTTCGGTGGT3'
lip L32R	5'CTACCGATTTTCGCTGTTGGG3'
16SF	5'GGCGGCGCGTCTTAACATG3'
16SR	5'TTCCCCCATTTAGCAAGATT3'

Obs.: Os nucleotídeos marcados em vermelho representam pontos de “mismatch” os quais não foram degenerados.

As reações de PCR com a finalidade de amplificar os genes inteiros (5 a 7 kb) foram realizadas em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) utilizando a seguinte programação: 94°C por 2 minutos seguido de 35 ciclos que incluem 94°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos e 68°C por 5 a 7 minutos. Uma etapa final de 68°C por 7 minutos foi incluída.

Os componentes que fazem parte desta reação são: 1,5µl de 5X buffer A, 3,5µl de 5X buffer B, 0,5 µl de 10 mM dNTPs, 1,0 µl de 10 pmol.µl⁻¹ conjunto de *primers*, 200 ng de DNA genômico e 0,5 µl (2,5 unidades) da enzima Elongase, para um volume final de reação de 25 µL.

As regiões codificadoras inteiras dos genes *lig* foram submetidos à avaliação em gel de agarose 0,8%. Os produtos gerados foram clonados nos vetores pCR2.1, o qual é parte do sistema de clonagem rápida “Topo-TA cloning Kit” (Invitrogen).

Os *primers* usados na amplificação dos respectivos genes, oriundos dos sorovares de *L. interrogans*, não foram os mesmos utilizados na amplificação dos genes derivados dos sorovares de *L. noguchii* e *L. weilli*. Para as últimas os *primers* são denominados *ligB* alternativo – *ligBAF* e *ligBAR* (Tab. 2).

A cepa Top10 F' de *Escherichia coli* (Invitrogen) foi cultivada em meio LB líquido à 37°C e tornada competente segundo protocolo de preparação de células eletrocompetentes (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Essa cepa foi transformada por eletroporação e semeada em meio LB sólido suplementada com 50µg.ml⁻¹ de canamicina ou 100 µg.ml⁻¹ de ampicilina quando necessário. *E. coli* Top10 F' contendo os plasmídeos recombinantes foram cultivadas em LB líquido, da mesma forma já mencionada, sendo o cultivo suplementado com 50µg.ml⁻¹ de canamicina ou 100 µg.ml⁻¹ de ampicilina quando conveniente. Os plasmídeos recombinantes foram extraídos segundo protocolo do “GFX microplasmid prep kit” (Amersham – GE Healthcare) e submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% a fim de que fossem quantificados.

Ainda, alguns dos *primers* degenerados anteriormente descritos foram usados para a amplificação de produtos internos aos genes *lig* (Tab. 2). Além destes, *primers* para a amplificação de um fragmento interno ao gene *ligB* nas espécies *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. borgpetersenii* e *L. santarosai*, e *primers* para amplificação dos controles, foram desenhados e analisados conforme anteriormente descrito (Tab. 2).

Os produtos internos aos genes *lig* foram amplificados por PCR segundo as condições mencionadas: uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos

seguido de 35 ciclos que incluem 94°C por 30 segundos, 52-54°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Uma etapa final de 72°C por 7 minutos foi incluída.

Os componentes que fazem parte desta reação são: 2,5 µl de 10X tampão, 0,75 µL de 50 mM de MgCl₂, 0,5 µl de 10 mM dNTPs, 2,0 µl de 10 pmol.µl⁻¹ conjunto de *primers*, 50 ng de DNA genômico e 0,25 µl (2,5 unidades) da enzima Taq DNA polimerase.

Os produtos de PCR amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os fragmentos derivados do gene *ligB* foram seqüenciados.

Os genes *ligA*, *ligB* e *ligC* foram seqüenciados na sua totalidade mediante o uso de *primers* degenerados desenhados para a estratégia de “primer walking” (Tabela 2). Um mínimo de 4 leituras por base foi gerada com o uso de *primers* em ambos os sentidos, a fim de confirmar com exatidão cada base componente dos genes em questão. O seqüenciamento foi realizado em equipamento MegaBace 500 (Amersham – GE Healthcare) mediante a tecnologia Dye-terminator de incorporação de dideoxi-nucleotídeos. A montagem das “contigs” e análise das seqüências foi efetuada no programa ContigExpress que faz parte do pacote que contém o software Vector NTi (Invitrogen). As seqüências das contigs foram inseridas no programa Vector NTi 8.0 (Invitrogen) e utilizadas para a montagem dos genes *lig*.

A região codificadora do rDNA 16S foi também amplificada a partir de todas as cepas usadas no estudo, usando os *primers* universais fD1 e rP2. Os produtos foram purificados e seqüenciados com o intuito de confirmar a identidade das cepas e descartar a possibilidade de contaminação.

3.4. Detecção dos genes *lig* por Southern blot

Os fragmentos internos mencionados anteriormente, oriundos dos genes *ligA* e *ligB* das cepas virulentas de *L. interrogans* e *L. kirschneri*, foram amplificados por PCR e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% a fim de que fosse verificada a correta amplificação de um produto de 536pb. Após, foram purificados segundo protocolo de purificação de DNA em solução do “GFX PCR DNA and Gel Band purification kit” (Amersham – GE Healthcare) e utilizados como sonda para a detecção dos genes *ligA* e *ligB* nas amostras de DNA genômico de *L. interrogans* e *L. kirschneri*. 2µg de DNA genômico foram tratados com a enzima *Bam*HI até a completa

digestão do DNA. O DNA digerido foi submetido a eletroforese “overnight” em gel de agarose 1% a 30V. Como controle foi adicionado também DNA genômico de *L. biflexa*, sabidamente uma saprófita e que não apresenta os genes *lig*. O DNA foi visualizado em transiluminador ultravioleta e em seguida transferido para uma membrana de nitrocelulose carregada positivamente seguindo o protocolo descrito no “ECL direct labelling and detection kit” (Amersham – GE Healthcare). A sonda foi marcada com peroxidase e incubada juntamente com a membrana em garrafa de hibridização, “overnight” a 42°C. O procedimento foi realizado em forno de hibridização em um carrossel rotatório. Vinte mililitros de tampão foram utilizados para a membrana produzida, a qual apresentava dimensões de 15X15cm. Após a hibridização, a membrana foi submetida a sucessivas lavagens com tampão apropriado descrito no manual do kit mencionado (ECL – Amersham – GE Healthcare). A detecção das bandas foi realizada em sala escura. Sobre a membrana produzida foi adicionado luminol, o qual é formado pela mistura em partes iguais dos reagentes de detecção 1 e 2 do kit mencionado (ECL – Amersham – GE Healthcare). As bandas puderam ser observadas mediante a exposição do filme de raio-X (Kodak) à membrana de nitrocelulose por 3 horas.

3.5. Análise dos genes e alinhamento

Os genes montados foram analisados por softwares de bioinformática com relação ao tamanho da região codificadora, peso molecular e tamanho da proteína. Para tal foi utilizado o software Vector NTi 8.0, (Invitrogen). O mesmo foi utilizado para fazer a tradução *in silico* das proteínas LigA, LigB e LigC e efetuar as análises mencionadas. Programas de bioinformática disponíveis na internet como SMART (www.smart.embl-heidelberg.de) e Pfam (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/) foram utilizados com a finalidade de verificar o número, tamanho e distribuição dos domínios Big2, a partir das seqüências das proteínas geradas *in silico*. Por fim, o alinhamento entre as seqüências de lig geradas e aquelas disponíveis no GenBank, tanto no nível de nucleotídeos quanto de aminoácidos, foi efetuado no programa AlignX (Invitrogen). Além disso, o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), o qual serve à finalidade de alinhar seqüências de genes e proteínas contra as seqüências depositadas no GenBank, foi utilizado durante o curso deste estudo.

3.6. Análise filogenética

As seqüências de nucleotídeos geradas foram utilizadas para a montagem de árvores filogenéticas. Para isso, o software Mega3 (Grisoft) foi utilizado. As seqüências de LigB, no nível de nucleotídeos, foram organizadas no formato FASTA, as quais receberam como identificação a primeira letra da espécie genômica a que pertenciam seguida pelo nome do sorovar e por fim o nome da cepa ou isolado. As árvores montadas foram construídas pelo método de Neighbor-joining, tendo como modelo a distância de P. Foram testadas 500 e 1000 *bootstraps* durante a análise. Porém, a árvore finalmente construída assume o valor de 1000 *bootstraps*. A árvore demonstrada leva em consideração uma escala de variação de 10% entre os genes e proteínas.

4. RESULTADOS

4.1. Seqüenciamento dos genes *ligA*, *ligB* e *ligC* de isolados de *Leptospira* spp.

Os genes *ligA*, *ligB* e *ligC* foram amplificados dos diferentes sorovares de *Leptospira* spp. patogênicas. A existência de polimorfismo entre as seqüências das diferentes espécies impediu que os *primers* utilizados para *L. interrogans* fossem também utilizados para as demais espécies. Os *primers forward* utilizados para amplificar os genes *ligA* e *ligB* anelam em uma posição anterior ao início da região codificadora, uma vez que a porção idêntica entre *ligA* e *ligB* se estende pela região reguladora. Entretanto, em *L. noguchii* e *L. weilli*, a região reguladora não foi incluída. Os *primers* capazes de amplificar *ligB* nestas espécies anelam em uma posição logo antes do primeiro sítio ATG.

Todos os genes *lig* amplificados foram clonados antes de serem submetidos ao seqüenciamento. Esta abordagem foi necessária, pois são fragmentos grandes, acima de 3kb, o que limita a eficiência do seqüenciamento direto do produto de PCR. Após a clonagem, os genes *ligA*, *ligB* e *ligC* foram seqüenciados na sua totalidade (Tab. 3).

Tabela 3 - Cepas usadas no seqüenciamento completo dos genes *lig*

Código	Espécie	Sorovar	Cepa/Isolado	Virulência	Gene seqüenciado
Pom	<i>L. interrogans</i>	Pomona	P10637-46	Virulento	<i>ligA</i> , <i>ligB</i> e <i>ligC</i>
Can	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Kito	Virulento	<i>ligA</i> , <i>ligB</i> e <i>ligC</i>
Can2	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Mex1	Virulento	<i>ligB</i>
Nog	<i>L. noguchii</i>	ND	Cascata	Virulento	<i>ligB</i>
Har	<i>L. borgpetersenii</i>	ND	USDA	Virulento	<i>ligB</i>
Heb	<i>L. weilli</i>	ND	Ecochallenge	Virulento	<i>ligB</i>

ND - Informação não disponível

O gene *ligA* das cepas *L. interrogans* Canicola Kito e *L. interrogans* Pomona P10637-46 foram amplificados e completamente seqüenciados (Tab. 4).

Tabela 4 - Genes detectados por PCR e análise comparativa dada pelo seqüenciamento.

Código	Detecção por PCR			Característica do DNA			Característica da Proteína		
				Tamanho do gene (pb)			Tamanho (aa)		
	<i>lig A</i>	<i>lig B</i>	<i>lig C</i>	<i>lig A</i>	<i>lig B</i>	<i>lig C</i>	LigA	LigB	LigC
Can	+	+	+	3675	5670	5865	1225	1890	1955
Can2	+	+	+	NS	5670	NS	NS	1890	NS
Pom	+	+	+	3672	5670	5865	1224	1890	1955
Nog	-	+	-	-	5805	-	-	1935	-
Heb	-	+	+	-	5694	NS	-	1898	NS
Har	-	+	-	-	5739	-	-	1913	-
Cop*	+	+	+	3675	5670	1494	1225	1890	498
Lai*	-	+	+	-	5670	5865	-	1890	1955
Gri*	+	+	+	3681	5661	1008	1227	1887	336
Man*	+	+	-	3675	3573	-	1225	1191	-
PomC*	+	+	+	3678	5670	5871	1226	1890	1957

NS - Gene não seqüenciado

* Genes depositados no GenBank

Os genes *ligA* dos sorovares Canicola e Pomona seqüenciados neste estudo apresentaram uma pequena diferença de tamanho. Enquanto que Canicola possui *ligA* com 3.675pb, Pomona possui 3pb a menos, o que corresponde a um códon. Esta diferença está no aminoácido lisina, o qual só está presente na seqüência sinal de LigA do sorovar Canicola. As tentativas para amplificar o gene *ligA* das demais espécies não foram bem sucedidas. Testes subseqüentes revelaram que este gene não está presente em *L. noguchii*, *L. weilli* e *L. borgpetersenii*.

Com relação ao gene *ligB*, ao contrário de *ligA*, este pode ser amplificado e seqüenciado a partir de todas as espécies em estudo. Este gene mostrou maiores diferenças de seqüência e estrutura quando comparado entre as diferentes espécies (Tab. 4). Entre os sorovares da espécie *L. interrogans*, *ligB* apresentou o mesmo tamanho, exceto na cepa do sorovar Manilae (Man). Porém entre as espécies *L. weilli* (Heb), *L. borgpetersenii* (Har) e *L. noguchii* (Nog), *ligB* demonstrou um tamanho variável. *L. weilli*, *L. borgpetersenii* e *L. noguchii* apresentam um gene *ligB* com 24, 69 e 135 nucleotídeos a mais que as cepas de *L. interrogans*, respectivamente (Tab. 4). A seqüência do gene *ligB* de *L. borgpetersenii* foi gentilmente cedida pelo Dr Richard L. Zuerner (USDA/ USA).

Dois genes *ligC* foram amplificados e seqüenciados, os quais derivam das cepas Canicola Kito e Pomona P10637-46. O gene *ligC* de ambas as cepas de *L.*

interrogans seqüenciadas apresentaram o mesmo tamanho (Tab. 4) e ao contrário dos genes *ligC* de *L. interrogans* FIOCRUZ L1-130 e *L. kirschneri* RM52, os quais estão depositados no GenBank, nenhum códon de terminação foi encontrado truncando a região codificadora. Esses resultados demonstram uma maior similaridade entre as seqüências dos genes *ligC* geradas e aquelas derivadas de *L. interrogans* Pomona e *L. interrogans* Lai, as quais também encontram-se depositadas no GenBank. Estas últimas também não apresentam qualquer códon de terminação nas seqüências dos genes *ligC*.

4.2. Caracterização *in silico* dos genes e proteínas LigA, LigB e LigC

Por meio de ferramentas de bioinformática, todas as ORFs correspondentes aos genes *lig* foram analisadas e caracterizadas segundo a presença e distribuição dos domínios Big2 nas proteínas codificadas. As ORFs foram caracterizadas ainda com relação à presença de um motivo C-terminal dentro dos genes *ligB* e *ligC*, bem como nas respectivas proteínas por estes codificadas.

As proteínas LigB de Canicola Kito, Pomona P10637-46 e Canicola Mex1, demonstraram ser estreitamente similares, tanto em relação ao número de aminoácidos quanto ao peso molecular desta proteína (Tab. 4). Estas características parecem ser um consenso entre LigB das cepas de *L. interrogans*.

Análises usando o programa SMART revelaram a presença de uma seqüência sinal de 21 aminoácidos (MKKIFCISIFLSMFFQS/GCMSW) na extremidade N-terminal de ambas as proteínas LigA e LigB, das cepas de *L. interrogans*. A seqüência encontrada em LigA é quase idêntica àquela de LigB, exceto pela substituição de um resíduo de serina por um de glutamina na posição 17 em LigB e pela ausência de uma lisina em LigA do sorovar Pomona P10637-46.

Análises por SMART e Pfam revelaram a presença de 13 domínios de Big2, dentro da proteína LigA, estendendo-se pelas regiões idêntica e não-idêntica (Fig. 1 Painel A). Por outro lado, a análise da proteína LigB revelou a presença de 12 domínios de Big2 nos sorovares da espécie *L. interrogans* e interessantemente também nos sorovares das espécies *L. weilli*, *L. borgpetersenii* e *L. noguchii*, além do motivo C-terminal já descrito (Fig. 1 Painel B). Os domínios Big2 variam de 80 a 86 aminoácidos em todas as proteínas, LigA e LigB, analisadas.

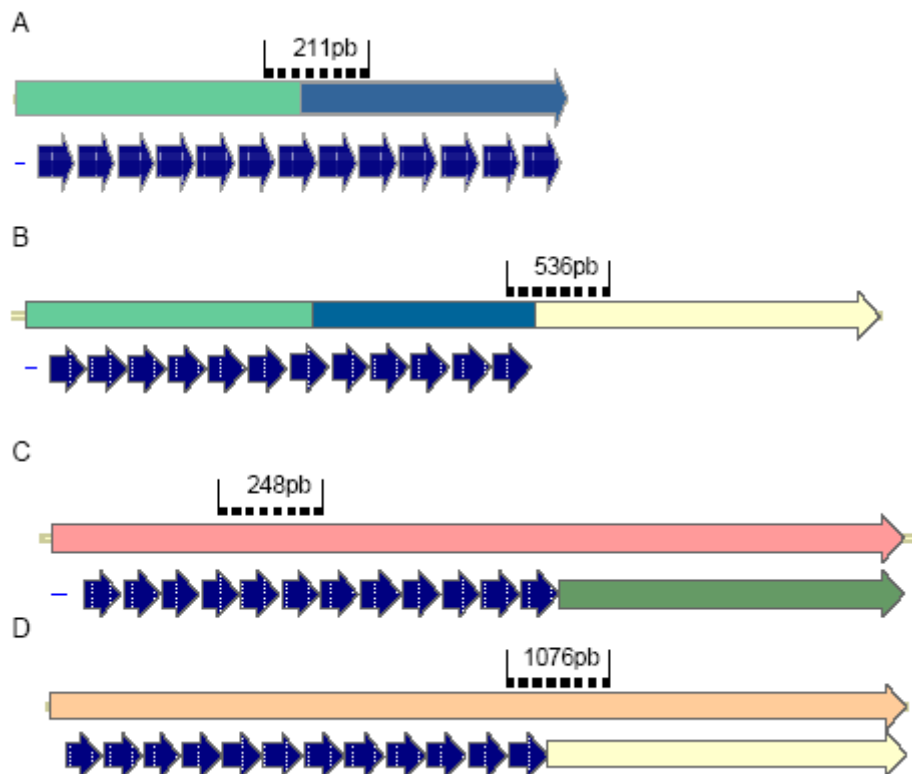


FIGURA 1. Caracterização *in silico* dos genes *lig*. **Painel A.** Estrutura do gene *ligA*. **Painel B.** Estrutura do gene *ligB*. **Painel C.** Estrutura do gene *ligC*. **Painel D.** Estrutura do gene *ligB* nas espécies *L. borgpetersenii*, *L. noguchii* e *L. weilli*. Região idêntica (verde claro); Região não-idêntica (azul); Motivo C-terminal (amarelo); Motivo C-terminal de *ligC* (verde escuro); *ligB* inteira (laranja); *ligC* inteira (vermelho). As setas contendo linhas correspondem aos domínios Big2. A sequência sinal é codificada pela pequena linha azul posicionada a frente de cada gene. As linhas tracejadas posicionadas acima de cada gene demonstram a posição e o tamanho correspondente a cada fragmento interno amplificado na detecção por PCR.

O motivo C-terminal de *L. noguchii* demonstrou ser marcadamente maior que aquele de outras espécies de *Leptospira* spp, contendo 809 aminoácidos. Este motivo C-terminal carrega 45, 17, 17 e 11 aminoácidos mais do que a C-terminal de *L. interrogans* Canicola Kito, *L. borgpetersenii* Hardjo USDA, *L. weilli* Hebdomadis Ecochallenge e *L. interrogans* Pomona P10637-46, respectivamente.

A análise da proteína LigC revelou a presença 12 domínios de Big2 e uma região C-terminal com 789 aminoácidos. Uma sequência sinal consenso foi observada, a qual compreende 35 aminoácidos (MKKIFSIFLSLFFQGCMVWPLVVGAVGLSTGNKGD). Estruturalmente, a proteína LigC demonstrou uma grande similaridade com as proteínas LigB, no que diz

respeito ao número de domínios Big2 e à presença da região C-terminal (Fig. 1 Painéis B e C).

Para avaliar o grau de conservação entre os genes e as proteínas Lig foi realizado um alinhamento entre as regiões codificadoras completamente seqüenciadas e aquelas oriundas do GenBank, bem como entre as proteínas por elas codificadas. Estas últimas compreendem os genes *lig* disponíveis para *Leptospira interrogans* Copenhageni FIOCRUZ L1-130, *Leptospira interrogans* Lai 56601, *Leptospira kirschneri* Grippotyphosa RM52, *Leptospira interrogans* Manilae e *Leptospira interrogans* Pomona. O software AlignX foi utilizado para realizar os alinhamentos comparativos e avaliar o grau de conservação dos genes e proteínas Lig. Conforme esperado, quando apenas genes de *L. interrogans* foram alinhados, a identidade mínima no nível de nucleotídeos e aminoácidos foi 87% e 84% respectivamente, para LigA (Tab. 5).

TABELA 5 – Conservação de LigA no nível de nucleotídeos e aminoácidos entre vários sorovares e espécies.

<i>ligA</i> DNA	Cop	PomC	Pom	Can	Man	Gri
<i>L. interrogans</i> copenhageni L1-130	100	90	87	90	97	92
<i>L. interrogans</i> pomona Chang		100	96	99	89	86
<i>L. interrogans</i> pomona P10637-46			100	98	86	83
<i>L. interrogans</i> canicola Kito				100	89	86
<i>L. interrogans</i> manilae					100	92
<i>L. kirschneri</i> grippotyphosa RM52						100
LigA proteína	Cop	PomC	Pom	Can	Man	Gri
<i>L. interrogans</i> copenhageni L1-130	100	84	85	87	97	91
<i>L. interrogans</i> pomona Chang		100	95	96	84	81
<i>L. interrogans</i> pomona P10637-46			100	98	85	82
<i>L. interrogans</i> canicola Kito				100	86	83
<i>L. interrogans</i> manilae					100	91
<i>L. kirschneri</i> grippotyphosa RM52						100

LigB demonstrou ser mais conservada entre as cepas de *L. interrogans*, com 94% e 93% de identidade, respectivamente (Tab. 6). Uma exceção ocorreu quando a seqüência de LigB do sorovar Manilae foi adicionada ao alinhamento, onde a identidade com outras cepas de *L. interrogans* foi de 65% e 63%, em nível de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente. Isso é devido à falta de parte do motivo C-terminal na proteína LigB oriunda da cepa deste sorovar. Interessantemente, a comparação interespecífica de *ligB* no nível de nucleotídeos

demonstrou que a identidade mínima foi 64% entre *ligB* de *L. interrogans* FIOCRUZ L1-130 e *L. borgpetersenii* e no nível de aminoácidos foi de 61%.

TABELA 6 – Conservação de LigB no nível de nucleotídeos e aminoácidos entre vários sorovares e espécies.

<i>ligB</i> DNA (%)	Cop	Lai	PomC	Pom	Can	Man	Gri	Nog	Heb	Har	Can2
<i>L. interrogans</i> copenhageni L1-130	100	96	97	94	96	64	93	74	69	65	96
<i>L. interrogans</i> lai 56601		100	100	95	97	65	94	74	69	65	97
<i>L. interrogans</i> pomona Chang			100	95	97	65	94	74	69	65	97
<i>L. interrogans</i> pomona P10637-46				100	97	62	92	73	68	64	97
<i>L. interrogans</i> canicola Kito					100	64	93	74	68	65	99
<i>L. interrogans</i> manilae						100	63	49	66	41	64
<i>L. kirschneri</i> grippotyphosa RM52							100	74	68	65	93
<i>L. noguchii</i> Australis* Cascata								100	69	64	74
<i>L. weilli</i> Hebdomadis* Ecochallenge									100	91	68
<i>L. borgpetersenii</i> Hardjo* USDA										100	65
<i>L. interrogans</i> canicola UCLA											100
LigB proteína (%)	Cop	Lai	PomC	Pom	Can	Man	Gri	Nog	Heb	Har	Can2
<i>L. interrogans</i> copenhageni L1-130	100	97	96	93	96	63	93	69	73	64	96
<i>L. interrogans</i> lai 56601		100	100	93	96	63	94	69	70	64	96
<i>L. interrogans</i> pomona Chang			100	93	96	63	94	69	70	64	96
<i>L. interrogans</i> pomona P10637-46				100	96	60	91	67	69	62	96
<i>L. interrogans</i> canicola Kito					100	63	94	69	69	64	99
<i>L. interrogans</i> manilae						100	61	44	58	39	63
<i>L. kirschneri</i> grippotyphosa RM52							100	69	70	63	94
<i>L. noguchii</i> Australis* Cascata								100	71	61	69
<i>L. weilli</i> Hebdomadis* Ecochallenge									100	93	69
<i>L. borgpetersenii</i> Hardjo* USDA										100	64
<i>L. interrogans</i> canicola UCLA											100

* Sorogrupo

Ainda, o alinhamento incluindo a sequência parcial de nucleotídeos e aminoácidos, oriunda da amplificação de parte da *ligB* de *L. santarosai* Alexi HS616, reforçou que a conservação de LigB é relativamente alta, quando se pensa na comparação de genes entre espécies genômicas diferentes. No nível de nucleotídeos, a identidade se manteve superior a 65% enquanto a identidade da sequência de aminoácidos foi de 59% (Não demonstrado).

Com base no alinhamento de LigC, no nível de nucleotídeos e aminoácidos, foi possível ser verificado seu grau de conservação. Para ambos os níveis, as identidades foram de pelo menos 98%, exceto quando o gene *ligC* de *L. kirschneri* foi incorporado na análise (Tab. 7). Isto se deve à presença de um códon de terminação motivado por uma alteração de fase de leitura nesta espécie, o que interrompe a

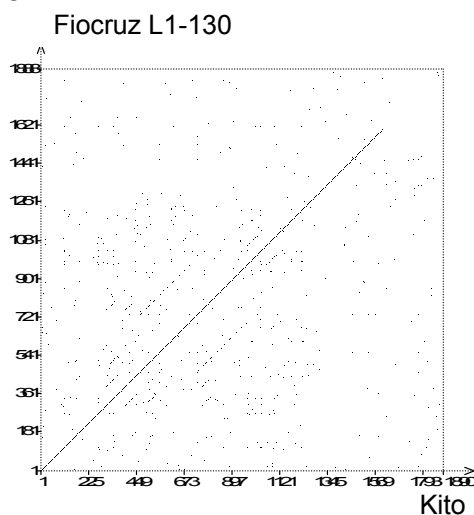
expressão da segunda metade da proteína LigC. Ainda, apenas a região anterior ao códon de terminação, presente no gene *ligC* de *L. interrogans* Copenhageni FIOCRUZ L1-130, foi considerada no alinhamento.

TABELA 7 – Conservação de LigC no nível de nucleotídeos e aminoácidos entre vários sorovares e espécies.

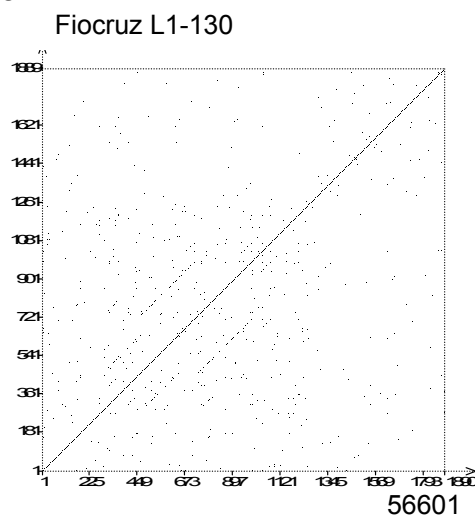
ligC DNA (%)	Cop	Gri	PomC	Pom	Can	Lai
<i>L. interrogans</i> copenhageni L1-130	100	90	99	99	98	99
<i>L. kirschneri</i> grippotyphosa RM52		100	90	90	90	90
<i>L. interrogans</i> pomona Chang			100	99	98	100
<i>L. interrogans</i> pomona P10637-46				100	99	99
<i>L. interrogans</i> canicola Kito					100	98
<i>L. interrogans</i> lai 56601						100
LigC protein (%)	Cop	Gri	PomC	Pom	Can	Lai
<i>L. interrogans</i> copenhageni L1-130	100	90	100	99	98	100
<i>L. kirschneri</i> grippotyphosa RM52		100	90	90	89	90
<i>L. interrogans</i> pomona Chang			100	99	98	100
<i>L. interrogans</i> pomona P10637-46				100	99	99
<i>L. interrogans</i> canicola Kito					100	98
<i>L. interrogans</i> lai 56601						100

A comparação entre todas as proteínas LigB seqüenciadas neste estudo e aquelas oriundas do GenBank permitiu identificar qual proteína apresenta a maior conservação com as outras na seqüência de aminoácidos. Entre todas, LigB de *L. interrogans* Copenhageni FIOCRUZ L1-130 mostrou a maior identidade cruzada (Fig. 2).

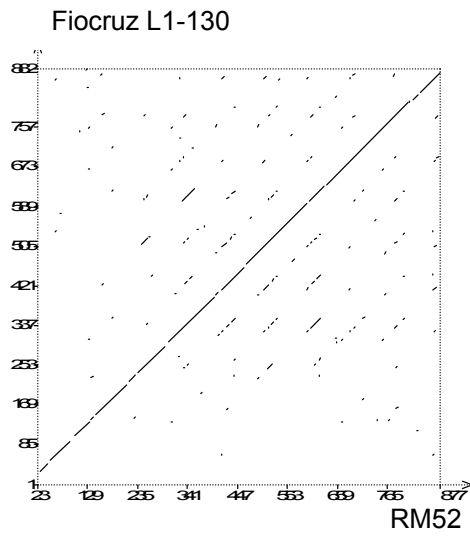
Painel A



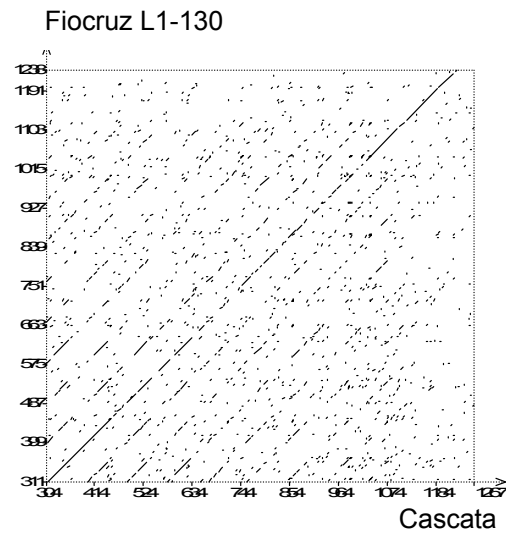
Painel B



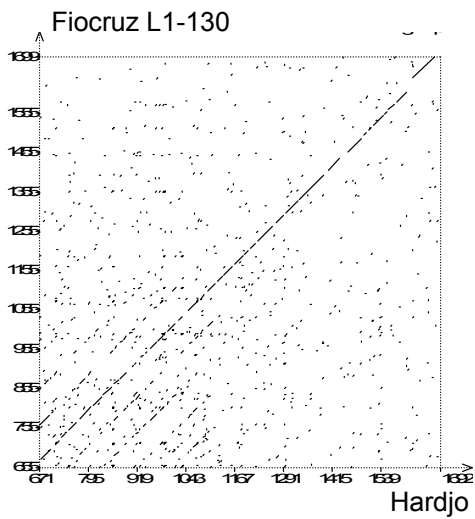
Painel C



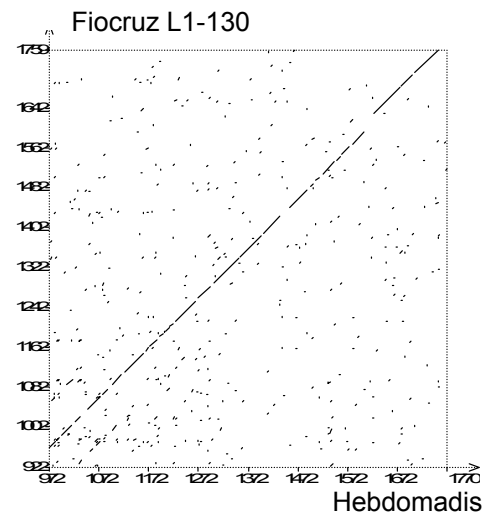
Painel D



Painel E



Painel F



Painel G

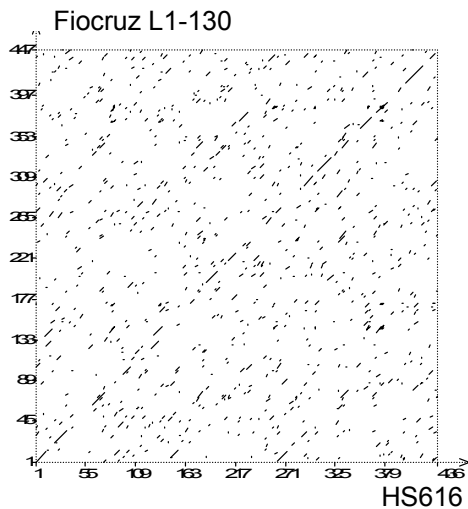
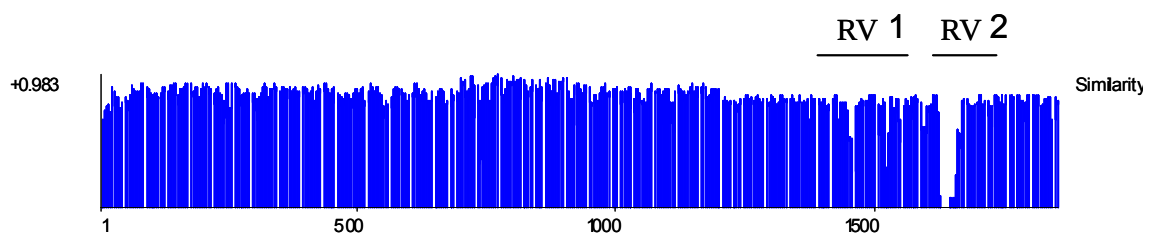


FIGURA 2. Plot demonstrando o nível de conservação ao longo da Proteína LigB entre os diferentes sorovares e espécies genômicas, contra LigB de *L. interrogans* Copenhageni FIOCRUZ L1-130. **Painel A.** LigB de L1130 vs Canicola Kito. **Painel B.** LigB de L1130 vs Lai 56601. **Painel C.** LigB de L1130 vs *L. kirschneri* RM52. **Painel D.** LigB de L1130 vs *L. noguchii* Cascata. **Painel E.** LigB de L1130 vs *L. borgpetersenii* USDA. **Painel F.** LigB de L1130 vs *L. weilli* Ecochallenge. **Painel G.** LigB de L1130 vs *L. santarosai* HS616. As diagonais indicam posições que contém aminoácidos mais conservados.

A maior variabilidade interespecífica na proteína LigB foi vista ocupando a porção final da região não-idêntica e o início da C-terminal. Esta porção contém inserções e deleções cuja presença varia de acordo com a espécie genômica de *Leptospira* spp. Duas regiões foram encontradas com base no alinhamento das seqüências das proteínas LigB das diferentes espécies, as quais foram denominadas de região variável 1 e 2 (RV1 e RV2) (Fig. 3).

A



B

RV1

		698				787
LigBCan	(693)	QFKATGTYDHSVQOVTALATWSSSNPRKAMVNNVTGS---	VTVATGNTNIKATIDSIS-	GSSVLNVTPALLT	SIEITPTINSITHGLT	
LigBCan2	(693)	QFKATGTYDHSVQOVTALATWSSSNPRKAMVNNVTGS---	VTVATGNTNIKATIDSIS-	GSSVLNVTPALLT	SIEITPTINSITHGLT	
LigBCop	(693)	QFKATGTYDHSVQOVTALATWSSSNPRKAMVNNVTGS---	VTVATGNTNIKATIDSIS-	GSSVLNVTPALLT	SIEITPTINSITHGLT	
LigBGr i	(693)	QFKATGTYDHSVQOVTALATWSSSNPRKAMVNNVTGS---	VTVATGNTNIKATIDSIS-	GSSVLNVTPALLT	SIEITPTINSITHGLT	
LigBHar	(693)	QFKATGTYDHSVQOVTALATWSSSNPRKAMVNNVTGS---	VTVATGNTNIKATIDSIS-	GSSVLNVTPALLT	SIEITPTINSITHGLT	
LigBHeb	(677)	QFKATATYDNTSGDITSAVSSSSDSNKALVNDILGGGLVTAVASANITARYENLS-	GSSAVNVTPATL	SIEITPTIPSSVAKGLT		
LigBLai	(693)	QFKATGTYDHSVQOVTALATWSSSNPRKAMVNNVTGS---	VTVATGNTNIKATIDSIS-	GSSVLNVTPALLT	SIEITPTINSITHGLT	
LigBMan	(693)	QFKATGTYDHSVQOVTALATWSSSNPRKAMVNNVTGS---	VTVATGNTNIKATIDSIS-	GSSVLNVTPALLT	SIEITPTINSITHGLT	
LigBNog	(696)	QFKATGTYDHSVQOVTALATWSSSNPRKAMVNNVTGS---	VTVATGNTNIKATIDSIS-	GSSVLNVTPALLT	SIEITPTINSITHGLT	
LigBPom	(693)	QFKATGTYDHSVQOVTALATWSSSNPRKAMVNNVTGS---	VTVATGNTNIKATIDSIS-	GSSVLNVTPALLT	SIEITPTINSITHGLT	
LigBPomC	(693)	QFKATGTYDHSVQOVTALATWSSSNPRKAMVNNVTGS---	VTVATGNTNIKATIDSIS-	GSSVLNVTPALLT	SIEITPTINSITHGLT	
LigB alexi	(1)	QFKATATYDNTSGDITSAVSSSSDSNKALVNDILGGGLVTAVASANITARYENLS-	GSSAVNVTPATL	SIEITPTIPSSVAKGLT		
		788				877
LigBCan	(779)	KQFKATGIFSDKSTONLTQLVTWISSDPSKIEIENTSGKK-	GIATASKLSSNKA	YKFIQSSPIPIV	TDLKLKSIITSPSSSSIAKG	
LigBCan2	(779)	KQFKATGIFSDKSTONLTQLVTWISSDPSKIEIENTSGKK-	GIATASKLSSNKA	YKFIQSSPIPIV	TDLKLKSIITSPSSSSIAKG	
LigBCop	(779)	KQFKATGIFSDKSTONLTQLVTWISSDPSKIEIENTSGKK-	GIATASKLSSNKA	YKFIQSSPIPIV	TDLKLKSIITSPSSSSIAKG	
LigBGr i	(779)	KQFKATGIFSDKSTONLTQLVTWISSDPSKIEIENTSGKK-	GIATASKLSSNKA	YKFIQSSPIPIV	TDLKLKSIITSPSSSSIAKG	
LigBHar	(782)	EQFKATGIFSDKSTONLTQLVTWISSDPSKIEIENTSGKK-	GIATASKLSSNKA	YKFIQSSPIPIV	TDLKLKSIITSPSSSSIAKG	
LigBHeb	(766)	EQFKATGIFSDKSTONLTQLVTWISSDPSKIEIENTSGKK-	GIATASKLSSNKA	YKFIQSSPIPIV	TDLKLKSIITSPSSSSIAKG	
LigBLai	(779)	KQFKATGIFSDKSTONLTQLVTWISSDPSKIEIENTSGKK-	GIATASKLSSNKA	YKFIQSSPIPIV	TDLKLKSIITSPSSSSIAKG	
LigBMan	(779)	KQFKATGIFSDKSTONLTQLVTWISSDPSKIEIENTSGKK-	GIATASKLSSNKA	YKFIQSSPIPIV	TDLKLKSIITSPSSSSIAKG	
LigBNog	(786)	KQFKATGIFSDKSTONLTQLVTWISSDPSKIEIENTSGKK-	GIATASKLSSNKA	YKFIQSSPIPIV	TDLKLKSIITSPSSSSIAKG	
LigBPom	(779)	KQFKATGIFSDKSTONLTQLVTWISSDPSKIEIENTSGKK-	GIATASKLSSNKA	YKFIQSSPIPIV	TDLKLKSIITSPSSSSIAKG	
LigBPomC	(779)	KQFKATGIFSDKSTONLTQLVTWISSDPSKIEIENTSGKK-	GIATASKLSSNKA	YKFIQSSPIPIV	TDLKLKSIITSPSSSSIAKG	
LigB alexi	(90)	EQFKATGIFSDKSTONLTQLVTWISSDPSKIEIENTSGKK-	GIATASKLSSNKA	YKFIQSSPIPIV	TDLKLKSIITSPSSSSIAKG	
		878				946
LigBCan	(868)	LTQOFKAIGTFIDGSEDEITNLVTWSSKSDVAPINNAANEKGLATALSTGSSNISA	YNSISNKNIF			
LigBCan2	(868)	LTQOFKAIGTFIDGSEDEITNLVTWSSKSDVAPINNAANEKGLATALSTGSSNISA	YNSISNKNIF			
LigBCop	(868)	LTQOFKAIGTFIDGSEDEITNLVTWSSKSDVAPINNAANEKGLATALSTGSSNISA	YNSISNKNIF			
LigBGr i	(865)	LTQOFKAIGTFIDGSEDEITNLVTWSSKSDVAPINNAANEKGLATALSTGSSNISA	YNSISNKNIF			
LigBHar	(871)	LTQOFKAKGIFTDGERDITNLVTWSSSEPLVADAINADENRGLAVSHIGSTELHAYYDSVESNSVNF				
LigBHeb	(855)	LTQOFKAKGIFTDGERDITNLVTWSSSEPLVADAINADENRGLAVSHIGSTELHAYYDSVESNSVNF				
LigBLai	(868)	LTQOFKAIGTFIDGSEDEITNLVTWSSKSDVAPINNAANEKGLATALSTGSSNISA	YNSISNKNIF			
LigBMan	(868)	LTQOFKAIGTFIDGSEDEITNLVTWSSKSDVAPINNAANEKGLATALSTGSSNISA	YNSISNKNIF			
LigBNog	(876)	SHQOLKATGKFRDGEITNLVTWSSSDPKVYSLSAADNRGLAVSHIGSTELHAYYDSVESNSVNF				
LigBPom	(867)	LTQOFKAKGIFTDGERDITNLVTWSSSEPLVADAINADENRGLAVSHIGSTELHAYYDSVESNSVNF				
LigBPomC	(868)	LTQOFKAIGTFIDGSEDEITNLVTWSSKSDVAPINNAANEKGLATALSTGSSNISA	YNSISNKNIF			
LigB alexi	(179)	LTQOFKAKGIFTDGERDITNLVTWSSSEPLVADAINADENRGLAVSHIGSTELHAYYDSVESNSVNF				

RV2

		1360
LigBCan	(1349)	SWGAIIRD SLDQEN LQSP KDRINF IGCNS PLNFM DGP IVS DPF GDS SDFGS LDVYNN QIYL
LigBCan2	(1349)	SWGAIIRD SLDQEN LQSP KDRINF IGCNS PLNFM DGP IVS DPF GDS SDFGS LDVYNN QIYL
LigBCop	(1349)	SWGAIIRD SLDQEN LQSP KDRINF IGCNS PLNFM DGP IVS DPF GDS SDFGS LDVYNN QIYL
LigBGr i	(1346)	SWGAIIRD SLDQEN LQSP KDRINF IGCNS PLNFM DGP IVS DPF GDS SDFGS LDVYNN QIYL
LigBHar	(1352)	VWGAIIRD SLDQEN LQSP KDRINF IGCNS PLNFM DGP IVS DPF GDS SDFGS LDVYNN QIYL
LigBHeb	(1337)	VWGAIIRD SLDQEN LQSP KDRINF IGCNS PLNFM DGP IVS DPF GDS SDFGS LDVYNN QIYL
LigBLai	(1349)	SWGAIIRD SLDQEN LQSP KDRINF IGCNS PLNFM DGP IVS DPF GDS SDFGS LDVYNN QIYL
LigBMan	(1342)	SWGAIIRD SLDQEN LQSP KDRINF IGCNS PLNFM DGP IVS DPF GDS SDFGS LDVYNN QIYL
LigBNog	(1357)	SWGAIIRD SLDQEN LQSP KDRINF IGCNS PLNFM DGP IVS DPF GDS SDFGS LDVYNN QIYL
LigBPom	(1347)	SWGAIIRD SLDQEN LQSP KDRINF IGCNS PLNFM DGP IVS DPF GDS SDFGS LDVYNN QIYL
LigBPomC	(1349)	SWGAIIRD SLDQEN LQSP KDRINF IGCNS PLNFM DGP IVS DPF GDS SDFGS LDVYNN QIYL
LigB alexi	(248)	SWGAIIRD SLDQEN LQSP KDRINF IGCNS PLNFM DGP IVS DPF GDS SDFGS LDVYNN QIYL
		1450
LigBCan	(1439)	DINATNRAS---S RDGGI PVPNYV TIGHT GCTLN ADITTG CGPDNE NGRGV FATGSL NKKS
LigBCan2	(1439)	DINATNRAS---S RDGGI PVPNYV TIGHT GCTLN ADITTG CGPDNE NGRGV FATGSL NKKS
LigBCop	(1439)	DINATNRAS---S RDGGI PVPNYV TIGHT GCTLN ADITTG CGPDNE NGRGV FATGSL NKKS
LigBGr i	(1436)	DINATNRAS---S RDGGI PVPNYV TIGHT GCTLN ADITTG CGPDNE NGRGV FATGSL NKKS
LigBHar	(1442)	DINATNRAS---S RDGGI PVPNYV TIGHT GCTLN ADITTG CGPDNE NGRGV FATGSL NKKS
LigBHeb	(1427)	DINATNRAS---S RDGGI PVPNYV TIGHT GCTLN ADITTG CGPDNE NGRGV FATGSL NKKS
LigBLai	(1439)	DINATNRAS---S RDGGI PVPNYV TIGHT GCTLN ADITTG CGPDNE NGRGV FATGSL NKKS
LigBMan	(1492)	DINATNRAS---S RDGGI PVPNYV TIGHT GCTLN ADITTG CGPDNE NGRGV FATGSL NKKS
LigBNog	(1447)	DINATNRAS---S RDGGI PVPNYV TIGHT GCTLN ADITTG CGPDNE NGRGV FATGSL NKKS
LigBPom	(1437)	DINATNRAS---S RDGGI PVPNYV TIGHT GCTLN ADITTG CGPDNE NGRGV FATGSL NKKS
LigBPomC	(1439)	DINATNRAS---S RDGGI PVPNYV TIGHT GCTLN ADITTG CGPDNE NGRGV FATGSL NKKS
LigB alexi	(248)	DINATNRAS---S RDGGI PVPNYV TIGHT GCTLN ADITTG CGPDNE NGRGV FATGSL NKKS
		1540
LigBCan	(1521)	NLDPKYI DMGEIT GLATAGTSSIAVDDRI HVGFAKKNNL NAPDFGKITFNTSQRNCAAG
LigBCan2	(1521)	NLDPKYI DMGEIT GLATAGTSSIAVDDRI HVGFAKKNNL NAPDFGKITFNTSQRNCAAG
LigBCop	(1521)	NLDPKYI DMGEIT GLATAGTSSIAVDDRI HVGFAKKNNL NAPDFGKITFNTSQRNCAAG
LigBGr i	(1518)	NLDPKYI DMGEIT GLATAGTSSIAVDDRI HVGFAKKNNL NAPDFGKITFNTSQRNCAAG
LigBHar	(1524)	NLDPKYI DMGEIT GLATAGTSSIAVDDRI HVGFAKKNNL NAPDFGKITFNTSQRNCAAG
LigBHeb	(1509)	NLDPKYI DMGEIT GLATAGTSSIAVDDRI HVGFAKKNNL NAPDFGKITFNTSQRNCAAG
LigBLai	(1521)	NLDPKYI DMGEIT GLATAGTSSIAVDDRI HVGFAKKNNL NAPDFGKITFNTSQRNCAAG
LigBMan	(1519)	NLDPKYI DMGEIT GLATAGTSSIAVDDRI HVGFAKKNNL NAPDFGKITFNTSQRNCAAG
LigBNog	(1537)	NLDPKYI DMGEIT GLATAGTSSIAVDDRI HVGFAKKNNL NAPDFGKITFNTSQRNCAAG
LigBPom	(1519)	NLDPKYI DMGEIT GLATAGTSSIAVDDRI HVGFAKKNNL NAPDFGKITFNTSQRNCAAG
LigBPomC	(1521)	NLDPKYI DMGEIT GLATAGTSSIAVDDRI HVGFAKKNNL NAPDFGKITFNTSQRNCAAG
LigB alexi	(248)	NLDPKYI DMGEIT GLATAGTSSIAVDDRI HVGFAKKNNL NAPDFGKITFNTSQRNCAAG
		1630
LigBCan	(1608)	-----SVDIV-----NYR TYKSDN SSINWg YVVGIDSLFVFEKEUL
LigBCan2	(1608)	-----SVDIV-----NYR TYKSDN SSINWg YVVGIDSLFVFEKEUL
LigBCop	(1608)	-----SVDIV-----NYR TYKSDN SSINWg YVVGIDSLFVFEKEUL
LigBGr i	(1605)	-----SVDIV-----NYR TYKSDN SSINWg YVVGIDSLFVFEKEUL
LigBHar	(1613)	DEEYKGR VGSTAR LIRTL AAKNN-----GNPNQLGDSINWg YVVGIDSLFVFEKEUL
LigBHeb	(1599)	DEYKGR VGSTAR LIRTL AAKNN-----GNPNQLGDSINWg YVVGIDSLFVFEKEUL
LigBLai	(1609)	-----VEDIV-----NYR TYKSDN SSINWg YVVGIDSLFVFEKEUL
LigBMan	(1492)	-----VEDIV-----NYR TYKSDN SSINWg YVVGIDSLFVFEKEUL
LigBNog	(1627)	IITVERT KKVLR LGLSD LAPENRPFIEKKVKNNLN LN SSINWg YVVGIDSLFVFEKEUL
LigBPom	(1607)	-----VD AVNYR TYKSDN SSINWg YVVGIDSLFVFEKEUL
LigBPomC	(1609)	-----VD VVNYR TYKSDN SSINWg YVVGIDSLFVFEKEUL
LigB alexi	(248)	-----VD VVNYR TYKSDN SSINWg YVVGIDSLFVFEKEUL

FIGURA 3. Localização das regiões mais variáveis dentro da sequência de aminoácidos de LigB. **Painel A.** Histograma da variabilidade interespecífica de *ligB* e posicionamento das duas regiões com maior polimorfismo. **Painel B.** Alinhamento entre as regiões mais variáveis de LigB nas diferentes espécies. As cepas e os códigos referentes as amostras usadas podem ser melhor visualizadas na Tab. 1.

4.3. Desenvolvimento de um método de detecção dos genes *lig* por PCR

Um método de detecção dos genes *lig* por PCR foi desenvolvido de forma a permitir a rápida caracterização dos sorovares de *Leptospira* spp. quanto à presença dos genes *ligA*, *ligB* e *ligC*. Nesta abordagem, um fragmento de DNA foi amplificado, a partir de cada gene, como um marcador, usando um conjunto específico de *primers*.

Mediante o uso de um controle interno da amplificação, um fragmento de 770pb do gene *lipL32*, pode ser afirmado que o DNA genômico derivava de amostras de leptospiros patogênicas. Pela amplificação e seqüenciamento do 16S rDNA, a identidade das amostras usadas no método de detecção por PCR e a presença de DNA genômico, no caso das amostras saprófitas, puderam ser certificadas. Primeiramente foi validado o teste utilizando as cepas cujos genes *lig* haviam sido amplificados e seqüenciados. Posteriormente, este teste foi utilizado para outras amostras.

Os produtos de PCR amplificados correspondem a um fragmento de 211pb para *ligA* (Fig. 4 painel A), 536pb para *ligB* dos sorovares pertencentes às espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri* (Fig. 4 painel B), 1076pb para *ligB* das demais espécies (Fig. 4 painel D) e 248pb para *ligC* (Fig. 4 painel C). O produto de 1076pb, derivado de *ligB*, foi amplificado por um par de *primers* alternativo denominado PSB2 (Tab. 2).

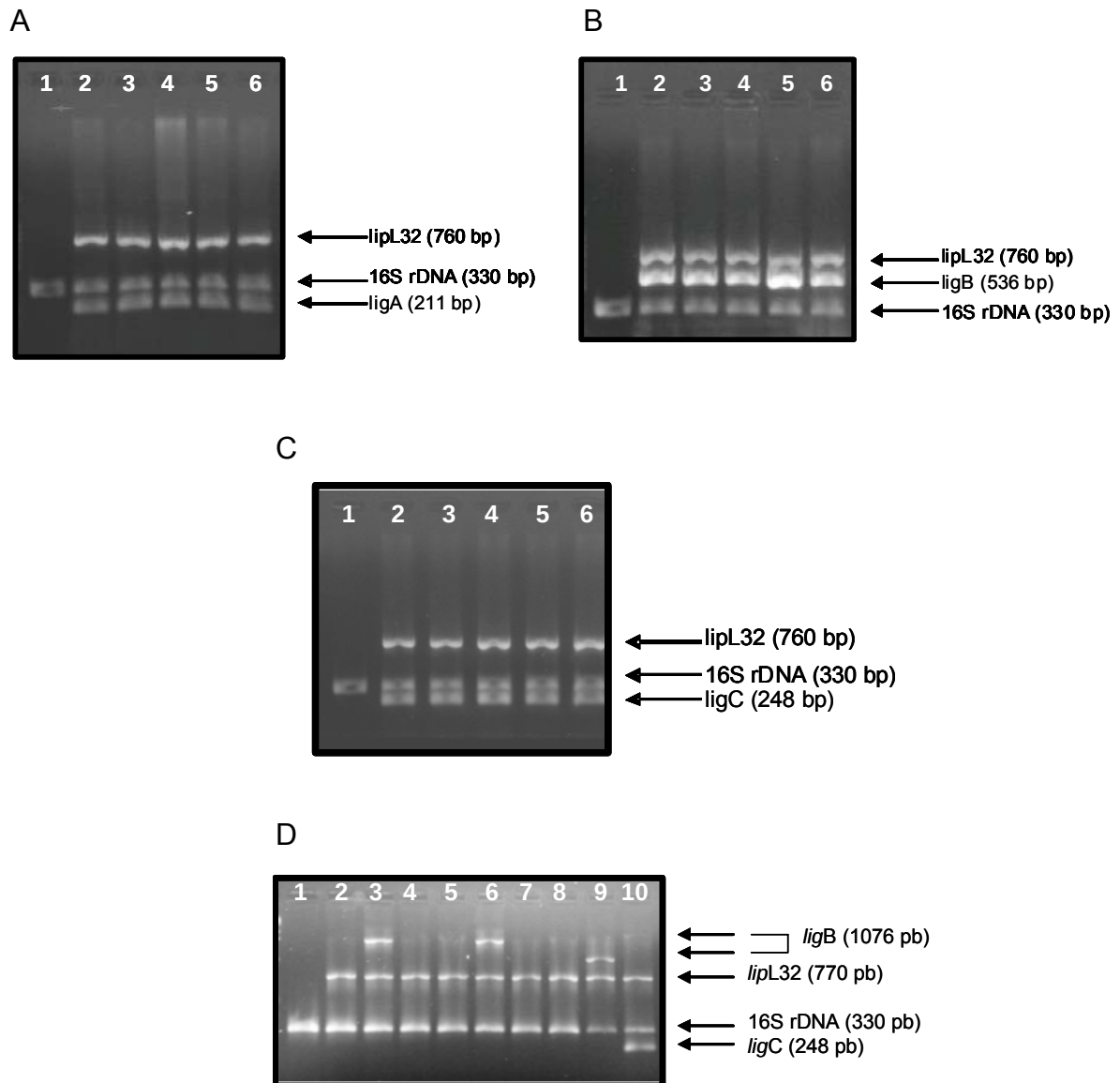


FIGURA 4. Detecção dos genes *lig* em cepas patogênicas, por PCR. **Painel A.** Detecção de *ligA*. **Painel B.** Detecção de *ligB*. **Painel C.** Detecção de *ligC*. **1.** *L. biflexa* Patoc1. **2.** *L. interrogans* FIOCRUZ L1-130. **3.** *L. kirschneri* RM52. **4.** *L. interrogans* Canicola Mex1. **5.** *L. interrogans* Canicola Kito. **6.** *L. interrogans* Pomona P10637-46. **Painel D.** Detecção dos genes *lig* nas cepas patogênicas de *L. noguchii* Bataviae e *L. weilli* Hebdomadis. **1.** *L. biflexa* Patoc1. **2.** *L. noguchii* Hook *ligA*. **3.** *L. noguchii* Hook *ligB*. **4.** *L. noguchii* Hook *ligC*. **5.** *L. noguchii* Cascata *ligA*. **6.** *L. noguchii* Cascata *ligB*. **7.** *L. noguchii* Cascata *ligC*. **8.** *L. weilli* Ecochallenge *ligA*. **9.** *L. weilli* Ecochallenge *ligB*. **10.** *L. weilli* Ecochallenge *ligC*. As amostras referentes ao controle sem DNA não foram demonstradas.

Para confirmar a amplificação dos genes *ligA*, *ligB* e *ligC*, alguns dos produtos amplificados foram seqüenciados e as seqüências geradas foram submetidas a

alinhamento por BLAST (NCBI, USA) e AlignX (Invitrogen). Dessa forma, foi descartada a possibilidade de amplificação inespecífica.

Nenhum resultado foi obtido usando o BLAST para a sequência dos produtos amplificados a partir de *L. weilli* Ecochallenge. Isto se deve ao fato de que esta espécie apresenta bastante divergência na sequência de DNA em relação aos genes *lig* depositados no GenBank, os quais pertencem às espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri*.

Segundo análise por bioinformática dos genes *lig* de *L. interrogans* e *L. kirschneri* disponíveis no GenBank, o par de *primers* escolhido para *ligA* amplifica um produto que corresponde ao início da região não-idêntica. Já aqueles selecionados para *ligB* amplifica um produto que se estende desde o final da região não-idêntica até o início da C-terminal. Os fragmentos gerados a partir da *ligB* das cepas virulentas de *L. noguchii* demonstram ser maiores que aquele de *L. weilli*. Isto é um reflexo inicial da variabilidade da sequência justamente no fragmento amplificado (Fig. 4 painel D). Para o gene *ligC*, a amplificação gera um produto que, com base nas sequências das regiões codificadoras de *ligC* de *L. interrogans* FIOCRUZ L1-130 e *L. kirschneri* RM52, cobre a região que contém o códon de terminação. Assim, mediante amplificação e sequenciamento deste fragmento, qualquer cepa poderia ser facilmente caracterizada com relação ao possível status de *ligC* como um pseudogene. Os fragmentos internos amplificados de cada gene podem ser melhor observados na Fig. 1.

Uma vez confirmada a aplicabilidade dos conjuntos de *primers* escolhidos para as diferentes espécies genômicas, os resultados foram extrapolados para um grande painel de amostras compreendendo 9 espécies genômicas de *Leptospira*. Entre estas, 6 são consideradas como o grupo central de espécies patogênicas, 1 é considerada como intermediária (*L. fainei*) e 2 outras pertencem ao grupo das saprófitas (*L. biflexa* e *L. meyeri*).

Conforme esperado, pelo método de detecção por PCR, a presença dos genes *ligA*, *ligB* e *ligC* pode ser confirmada nos sorovares das diferentes espécies patogênicas de *Leptospira*. Espécies saprófitas não apresentam genes *lig* (Tab. 8).

Tabela 8 - Caracterização da presença ou ausência dos genes *lig* nas diferentes espécies genômicas.

Species	Serovar	Strain	16S	<i>ligA</i>	<i>ligB</i>	<i>ligC</i>
<i>L. interrogans</i>	Copenhageni	L1130	+	+	+	+
<i>L. interrogans</i>	Lai	Lai	+	+	+	+
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	+	+	+	+
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Hond Utrech IV	+	+	+	+
<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Hardjoprajitno	+	+	+	+
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	3522C	+	+	+	+
<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	Sari	+	-	+	-
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Perepelicin	+	-	+	-
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Veldrat Bataviae 46	+	-	+	-
<i>L. noguchii</i>	Panama	CZ214K	+	-	+	+
<i>L. noguchii</i>	Orleans	LSU2580	+	-	+	-
<i>L. weilli</i>	Coxi	Cox	+	-	+	+
<i>L. weilli</i>	Ughia	LT8968	+	-	+	+
<i>L. santarosaii</i>	Alexi	HS616	+	-	+	-
<i>L. santarosaii</i>	Trinidad	TRVL34056	+	-	+	-
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	But6	+	-	+	-
<i>L. meyeri</i>	Semaranga	Veldrat 173	+	-	-	-
<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc1	+	-	-	-

O gene *ligB* aparece como o único presente entre todas as cepas de *Leptospira*. O gene *ligA* aparece com exclusividade nas cepas de *L. interrogans* e *L. kirschneri* (Tab. 8). Interessantemente, o gene *ligC* aparece também em número restrito de cepas. Porém, a presença deste gene parece ser sorovar-dependente, uma vez que dentre as amostras patogênicas que tiveram seus genes completamente seqüenciados, apenas aquelas de *L. noguchii* não apresentaram este gene (Fig. 4 Painel C e Tab. 4). Entretanto, outras cepas de *L. noguchii*, pertencente ao painel de amostras da OMS, demonstraram amplificação positiva para *ligC* e também o seqüenciamento do fragmento amplificado demonstrou alta identidade com outros genes de *ligC* depositados no GenBank (Tab. 5). Na cepa patogênica de *L. weilli*, o gene *ligC* pode ser amplificado por PCR (Fig. 4 painel D).

Como forma de validar o método de detecção por PCR, os produtos amplificados foram marcados e usados como sonda na hibridização por Southern blot. As sondas usadas na detecção dos genes *ligA* e *ligB* são oriundas da mistura de todos os produtos gerados na detecção por PCR de cada respectivo gene, os quais foram amplificados das cepas mencionadas na Tab. 8 e que aparecem na Fig. 4. As

hibridizações por Southern blot dos genes *ligA* e *ligB* foram realizadas apenas para as cepas virulentas das espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri* e nos permitem confirmar a presença ou ausência destes genes nestas espécies bem como validar o método de caracterização por PCR desenvolvido. Conforme esperado, todos os sorovares das espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri* demonstraram a presença dos genes *ligA* e *ligB* (Fig. 5). Em *L. interrogans* Copenhageni FIOCRUZ L1-130, *ligA* aparece com um tamanho de 4.751pb. Já nos sorovares Canicola e Pomona, as bandas aparecem um pouco mais altas, correspondendo a aproximadamente 4.850pb. Por outro lado, *L. kirschneri* Grippotyphosa RM52 apresentou a banda esperada de 2.761pb. os fragmentos esperados foram estipulados por simulação da análise de restrição dos genes *lig* “*in silico*”, com a enzima *Bam*HI. Com relação à presença do gene *ligB*, todos os sorovares das espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri* apresentaram praticamente o mesmo tamanho, o que já era esperado para este gene (Fig. 5). Tanto *ligA* quanto *ligB* apresentam-se como genes de cópia única nos sorovares de *L. interrogans* e *L. kirschneri*.

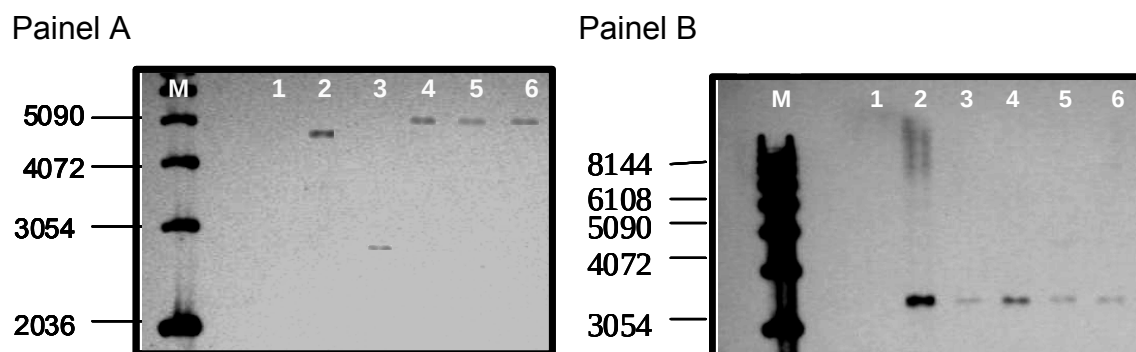


FIGURA 5. Análise por Southern blot demonstrando a presença dos genes *lig* nas cepas de *L. interrogans* e *L. kirschneri* virulentas. **Painel A.** Detecção de *ligA*. **Painel B.** Detecção de *ligB*. **M.** 1kb DNA Ladder (invitrogen). **1.** *L. biflexa* Patoc1. **2.** *L. interrogans* FIOCRUZ L1-130. **3.** *L. kirschneri* RM52. **4.** *L. interrogans* Canicola Kito. **5.** *L. interrogans* Canicola Mex1. **6.** *L. interrogans* Pomona P10637-46.

4.4. Análise filogenética

A construção de árvores filogenéticas baseadas nas seqüências geradas (tanto oriundas do seqüenciamento dos genes inteiros quanto do seqüenciamento do produto da caracterização por PCR) e naquelas depositadas no GenBank revelou resultados interessantes com relação aos aspectos evolutivos do gênero *Leptospira*. A montagem de uma árvore filogenética baseada em *ligA* e *ligC* seria pouco informativa em função da ausência destes genes em algumas cepas. Assim, árvores filogenéticas foram construídas com base apenas nas seqüências do gene *ligB* e na proteína por ele codificada (Fig. 6), uma vez que este gene foi encontrado em todas as cepas de *Leptospira* spp.

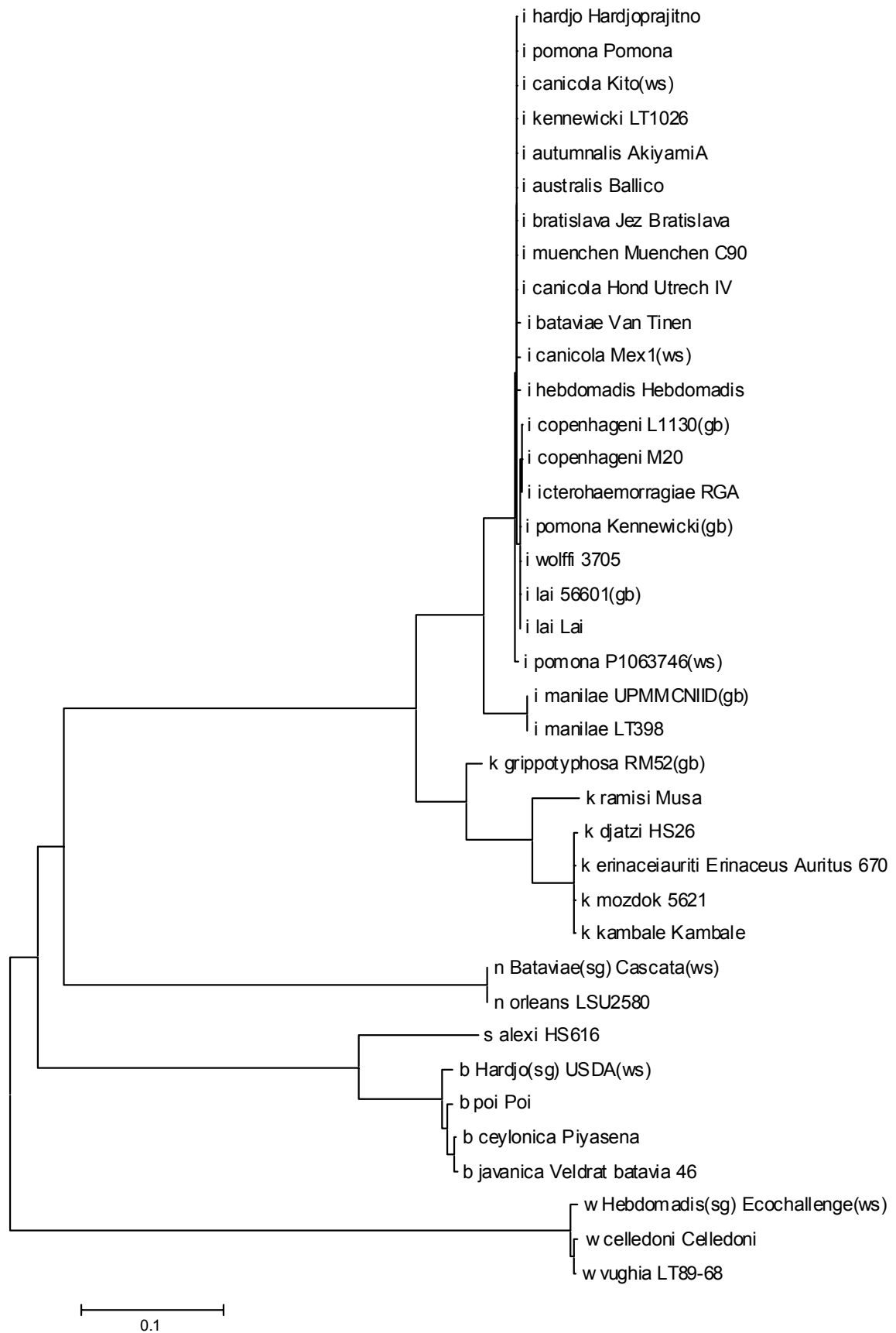


FIGURA 6. Árvore filogenética montada com base na sequência de nucleotídeos de *ligB*. As amostras usadas estão identificadas pela primeira letra do nome da espécie a que pertencem (minúsculo,) seguida pelo nome do sorovar e o nome da cepa. Quando a informação sobre o nome do sorovar não estava disponível, então o nome do sorogrupo foi utilizado (sg). Genes oriundos do GenBank, bem como as proteínas por eles codificadas, estão representados por (gb) enquanto as regiões codificadoras completamente seqüenciadas neste estudo estão representadas por (ws).

Pela análise da árvore filogenética construída, pode-se observar uma intensa aproximação entre as cepas de *L. interrogans*, as quais formam um grupo monofilético separado das demais (Fig. 6). Porém, pode ser notado que mesmo dentro do grupo das *L. interrogans*, as cepas do sorovar Manilae formam um subgrupo, provavelmente em função de diferenças pontuais dentro do gene *ligB* neste sorovar.

Dentro do ramo formado por *L. kirschneri*, todas também aparecem como um grupo monofilético. Porém, a cepa RM52 aparece mais próxima do grupo de *L. interrogans*. As demais espécies também aparecem como grupos monofiléticos, tanto em nível de nucleotídeos quanto de aminoácidos (Fig. 6).

5. DISCUSSÃO

As proteínas Lig, por se tratarem de adesinas de *Leptospira* spp., têm um importante papel na patogênese deste gênero de bactérias, pois acredita-se que mediem a adesão às células do tecido hospedeiro (BAROCCHI *et al.*, 2002; GUERREIRO *et al.*, 2001; MATSUNAGA *et al.*, 2003). Assim, estas constituem-se em importantes alvos para o sistema imune durante o período em que estão posicionadas na superfície e expostas para o exterior da bactéria. Assim como as adesinas de outras bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *Yersinia* spp., as prováveis adesinas, Lig, de *Leptospira* spp. apresentam domínios Big2 distribuídos uniformemente ao longo da seqüência da proteína. Estes domínios parecem ter papel fundamental na adesão bacteriana e são também encontrados na espiroqueta *Treponema pallidum* (FRASER *et al.*, 1998).

Neste estudo, os 3 genes *lig*, (*ligA*, *ligB* e *ligC*), oriundos de 6 diferentes sorovares e 4 espécies genômicas foram completamente seqüenciados. O levantamento da seqüência completa dos genes *lig* em cepas patogênicas de *Leptospira* spp. e sua análise comparativa com outros genes disponíveis no banco de dados permite uma investigação sobre a conservação que há entre estes genes, nas diversas espécies em que estão presentes.

A proteína LigC apresentou numericamente o maior grau de conservação entre as espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri*, espécies em que está presente. Porém, em *Leptospira interrogans* Lai 56601 e *L. kirschneri* Grippytyphosa RM52, esta proteína parece ser expressa na forma truncada, em função de um códon de terminação no meio da região codificadora. Diferentemente, este gene aparece com o status de um gene íntegro e expresso na sua totalidade em todas as outras cepas onde foi completamente seqüenciado. Ainda, o gene *ligC* parece estar presente entre as cepas de outras espécies, onde foi detectado por PCR, as quais compreendem *L. noguchii* e *L. weilli*. Porém, dentro da espécie *L. noguchii*, nem todos os sorovares demonstraram a presença deste gene. O sorovar Manilae de *L. interrogans*, cuja *ligA* e *ligB* estão depositadas no GenBank, parece não conter *ligC*. Assim, pode ser concluído que tanto o status de pseudogene quanto a sua presença são sorovar-dependentes.

Por sua vez, a proteína LigA apresentou alto nível de conservação. Porém, no caso desta proteína, a situação parece ser ainda mais intrigante uma vez que o gene *ligA* parece estar presente apenas em sorovares de *L. interrogans* e *L. kirschneri*, com exceção da cepa 56601 do sorovar Lai de *L. interrogans*. Mesmo entre as cepas de *L. interrogans*, o gene *ligA* parece não se fazer presente em todos os sorovares, conforme já mencionado para o sorovar Lai.

Sendo assim, os esforços maiores devem ser racionalmente concentrados sobre a proteína LigB, a qual se faz presente em todas as espécies estudadas até o momento e apresenta um bom nível de conservação, com identidade em nível de aminoácidos nunca inferior a 63%, comparando-se LigB de *L. interrogans* Copenhageni FIOCRUZ L1-130 com LigB de espécies como *L. borgpetersenii*, *L. weilli* e *L. noguchii*.

Dentre todas as LigB conhecidas e seqüenciadas até o momento, aquela oriunda de *L. interrogans* Copenhageni FIOCRUZ L1-130 aparece como a que conserva a maior identidade entre todas as espécies. Diversas análises comparativas foram testadas, porém LigB de FIOCRUZ L1-130 foi a que manteve o mais alto nível de conservação entre espécies diferentes. Entre as cepas de *L. interrogans*, todas as LigB mostraram uma elevada identidade, e mesmo entre espécies diferentes, porções foram vistas contendo seqüências de aminoácidos mais conservadas, as quais podem vir a conter importantes epitopos vacinais.

Um ponto interessante diz respeito à porção que carrega a maior variabilidade nas diferentes LigB. Foi evidenciado que a porção da proteína que contém a maior diversidade de seqüência se estende desde os últimos 420 aminoácidos da região que contém os domínios Big2 até aproximadamente a metade da região C-terminal.

A detecção de cada um destes genes por PCR se constitui numa ferramenta importante a qual possibilita a caracterização de isolados de *Leptospira* spp. A informação referente à presença ou ausência destes genes pode ser usada como justificativa racional quando do desenvolvimento de uma vacina de amplo espectro. Pelo método desenvolvido neste estudo, apenas o gene *ligB* pode ser detectado em todas as cepas. Tal informação não inviabiliza a utilização das outras proteínas Lig na construção de uma vacina, uma vez que *ligA* e *ligC* foram detectados em todas as cepas de *L. interrogans* e *L. kirschneri*, a exceção de *L. interrogans* Lai 56601. Estas espécies genômicas representam aquelas mais prevalentemente distribuídas pelo mundo e a maioria dos humanos e animais acometidos por leptospirose são na sua

maioria contaminados com sorovares destas espécies (FAINE *et al.*, 1999; KO *et al.*, 1999; LEVETT, 2001). Porém, quando se pensar em uma vacina única e de amplo espectro, deve-se levar em consideração a representatividade da proteína LigB.

Mecanismos evolutivos que conduzem à produção de polimorfismos de nucleotídeo único e possivelmente à transferência horizontal de DNA foram vistos ocorrendo dentro da sequência codificadora de *ligB*, nos mesmos moldes do que ocorre com outras importantes lipoproteínas de *Leptospira* spp. (HAAKE *et al.*, 2004) e ainda em proteínas de adesão em outras bactérias Gram negativas como *Escherichia coli* e Gram positivas como *Streptococcus pyogenes* (TOWERS *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2002; TARR *et al.*, 2002).

Interessantemente, as deleções, inserções e substituições evidenciadas ocupam uma região com uma notável hidrofiliidade, a qual é predita de formar a alça mais exposta para o exterior da proteína. Nesse caso, a pressão positiva que conduz à intensa variabilidade neste ponto pode indicar uma maior adaptação à hospedeiros específicos ou ainda sugerir que as alterações de aminoácidos são melhor toleradas em alças na superfície. Assim, estas alterações teriam papel fundamental no adequado dobramento da proteína (TOWERS *et al.*, 2003).

A análise filogenética com base na sequência de LigB, tanto em nível de nucleotídeos quanto de aminoácidos, permitiu traçar a relação evolutiva e o grau de parentesco entre as cepas de *Leptospira* spp. Em função das diferenças interespecíficas de *ligB*, este gene, por meio da porção utilizada para a montagem da árvore filogenética, pode servir como um alvo na diferenciação de espécies, o que até então é alcançado com precisão apenas por ensaios de hibridização DNA-DNA (LEETOCART *et al.*, 1999) ou pelo seqüenciamento do rDNA 16S (Woese, 2000). A análise da sequência dos genes *ompL1*, *lipL32* e *lipL41* (HAAKE *et al.*, 2004) não permitiu essa diferenciação entre espécies, como foi visto para a região seqüenciada do gene *ligB*.

Diferentemente da situação encontrada para *lipL32*, cuja diferenciação entre *L. borgpetersenii* e *L. weilli* se mostrou ineficiente (HAAKE *et al.*, 2004), o método baseado em *ligB* apresentou um grande poder de diferenciação. Um fragmento de aproximadamente 450 pb foi seqüenciado a partir dos produtos de PCR gerados durante a detecção de *ligB* por PCR e, aparentemente, tal região apresenta polimorfismo suficiente para permitir a correta classificação taxonômica do gênero

Leptospira no nível de espécie. A sequência obtida apresentou-se bastante robusta, tanto com relação à facilidade de sua amplificação quanto ao seu seqüenciamento.

A identidade de sequência entre *L. interrogans* e *L. kirschneri* é bastante alta e nenhum ponto de intensa variabilidade foi evidenciado. Em *L. interrogans*, um agrupamento que se destacou foi formado por duas cepas do sorovar Manilae, sendo uma isolada de rato e outra de humanos. Outro agrupamento de *L. interrogans*, porém menos destacado, foi formado pelos sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni e Lai. Estes formaram também um ramo separado, porém demonstraram uma distância menor em relação aos outros sorovares do que aquela vista para Manilae. Alguns sorovares de *L. kirschneri*, encontram-se próximos dos de *L. interrogans*, como é o caso do Grippotyphosa RM52, o que pode ser indicativo de um ancestral evolutivo comum.

A diferenciação de espécies, baseada em *ligB*, aparece como um método que pode ser empregado para as cepas de leptospiros patogênicas. Porém, evidentemente apresenta restrições quanto à sua aplicação para cepas de espécies saprófitas.

A grande maioria das amostras empregadas na montagem da árvore filogenética deste estudo já havia sido anteriormente testada quanto ao potencial de *lipL32* como um *loci* diferenciador de espécies, usando o gene 16S como um padrão (HAAKE *et al.*, 2004). Interessantemente, a árvore montada com base em *ligB* obteve resultados similares àquela montada anteriormente para o gene do rDNA 16S, sobre as mesmas amostras. O seqüenciamento do rDNA 16S é uma abordagem padrão para a análise filogenética (WOESE, 2000) e até o momento nenhum gene de *Leptospira* spp. havia sido capaz de substituir a altura o poder discriminatório do 16S.

Mediante as análises comparativas deste estudo foi possível demonstrar ainda a possibilidade de se basear o desenvolvimento de uma vacina contra leptosirose nas proteínas Lig, as quais aparecem como potenciais antígenos protetores em função de sua exposição na superfície, regulação no hospedeiro, estrutura e participação na patogênese molecular de *Leptospira* spp.

Em função dos achados deste estudo, LigB surge como um candidato em potencial a ser explorado na produção de uma vacina por apresentar-se amplamente distribuída e ser relativamente conservada entre as diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* spp.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALLARD, S.A., SEGERS, WILLIAMSON, M., ADLER, B., VINH, T., AND FAINE, S. (1986) Interactions of virulent and avirulent leptospires with primary culture of renal epithelial cells. *Journal Medical Microbiology* 21: 69-67.
- BARNETT, J.K., BARNETT, D., BOLIN, C.A., SUMMERS, T.A., WAGAR, E.A., CHEVILLE, N.F., HARTSKEERL, R.A., AND HAAKE, D.A. (1999). Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infection and Immunity*. 67: 853-861.
- BAROCCHI, M.A., KO, A.I., REIS, M.G., MCDONALD, K.L., AND RILEY, L.W. (2002) Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infection and Immunity* 70: 6926-6932.
- BREENER, D.J., KAUFMANN, A.F., SULZER, K.R., STEIGERWALT, A.G., ROGERS, F.C., WEYANT, R.S. (1999) Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov, and four new *Leptospira* genomospecies. *International Journal of Systematics and Bacteriology*. 49: 839-858.
- CULLEN, P.A., CORDWELL, S.J., BULACH, D.M., HAAKE, D.A., ADLER, B. (2002) Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infection and Immunity*. 70: 2311-2370.
- CULLEN, P.A., HAAKE, D.A., AND ADLER, B. (2004). Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiology Reviews* 28(3): 291-318.
- CULLEN, P.A., XU, X., MATSUNAGA, J., SANCHEZ, Y., KO, A.I., HAAKE, D.A., ADLER, B. (2005). Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infection and Immunity*. 73: 4853-4863.
- FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., PEROLAT, P. (1999) *Leptospira* and Leptospirosis. Melbourne, Australia. MediSci.
- FRANKEL, G., CANDY, D.C.A, FABIANI, E., ADU-BOBIE, J., GIL, S., NOVAKOVA, M., PHILLIPS, A.D., DOUGAN, G. (1995) Molecular characterization of a carboxy-terminal eukaryotic-cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 63: 4323-4328.
- FRASER, C.M., NORRIS, S.J., WEINSTOCK, G.M., *et al.* (1998) Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science*. 281. 375-388.
- GAMBERINI, M., GÓMEZ, R.M., ATZIGEN, M.V., MARTINS, E.A.L., VASCONCELLOS, S.A., ROMERO, E.C., LEITE, L.C.C., HO, P.L., NASCIMENTO, A.L.T.O. (2005) Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiology letters* 244(2):305-313.

GUERREIRO, H., CRODA, J., FLANNERY, B., MAZEL, M., MATSUNAGA, J., REIS, M.G., LEVETT, P.N., KO, A.I., AND HAAKE, D.A. (2001). Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infection and Immunity*. 69: 4958-4968.

GREENBERG, E.P., AND PAROLA, C. (1977). Motility of flagellated bacteria in viscous environments. *Journal of Bacteriology* 132: 356-358.

HAAKE, D.A. (2000). Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* 146: 1491-1504.

HAAKE, D.A., CHAMPION, C.I., MARTINICH, C., SHANG, E.S., BLANCO, D.R., MILLER, J.N., AND LOVETT, M.A. (1993) Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *Journal of Bacteriology*. 175: 4225-4234.

HAAKE, D.A, SUCHARD, M.A., KELLEY, M.M., DUNDOO, M., ALT, D.P. AND ZUERNER, R.L. (2004) Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *Journal of Bacteriology* 186 (9): 2818-2828.

HAMBURGER, Z.A., BROWN, M.S., ISBERG, R.R., AND BJORKMAN, P.J. (1999) Crystal structure of invasins: a bacterial integrin-binding protein. *Science* 286: 291-295.

KO, A.I., GALVÃO REIS, M., RIBEIRO DOURADO C.M., JOHNSON, W.D., JR, RILEY L.W., AND GROUP T.S.L.S. (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet* 354: 820-825.

KOIZUMI, N. AND WATANABE, H. (2004) Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine* 22: 1545-1552.

LEETOCART, M., BOERLIN, P., BOERLIN-PETZOLD, F., GOUDET, J., BARANTON, G., PEROLAT, P. (1999) Genetic structure of the genus *Leptospira* by multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal of Systematics And Bacteriology*. 49: 231-238

LEVETT, P.N. (2001) Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 14 (2): 296-326.

LIN, M., DAN, H., LI, Y. (2004). Identification of a second flagellin gene and functional characterization of a σ^{70} -like promoter upstream of a *Leptospira borgpetersenii* *flaB* gene. *Current microbiology*. 48: 145-152.

LUO, Y., FREY, E.A., PFUETZNER, R.A., CREAGH, A.L., KNOECHEL, D.G., HAYNES, C.A., *et al.* (2000) Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature* 405: 1073-1077.

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. (2003)

Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular Microbiology* 49: 929-945.

MATSUNAGA, J., SANCHEZ, Y., XU, X., AND HAAKE, D.A. (2005) Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infection and Immunity* 73: 70-78.

MATSUNAGA, J., YOUNG, T.A., BARNETT, J.K., BARNETT, D., BOLIN, C.A., AND HAAKE, D.A. (2002) Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. *Infection and immunity* 70: 323-334.

MCBRIDE, A.J.A., ATHANAZIO, D.A., REIS, M.G., KO, A.I. (2005). Leptospirosis. *Current opinion in infectious diseases*. 18: 376-386.

MERIEN F., BARANTON, G., AND PEROLAT, P. (1997) Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infection and Immunity*. 65: 729-738.

NASCIMENTO, A.L.T.O., KO, A.I., DELLAGOSTIN, O.A. *et al* (2004). Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *Journal of Bacteriology* 186: 2164-2172.

NOGAYRÈDE, J.P., FERNANDES, P. J., DONNENBERG, M. S. (2003) Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cellular Microbiology* 5(6) 359-372.

PALANIAPPAN, R.U.M., CHANG, Y.F., JUSUF, S.S.D., TIMONEY, A.J.F., MCDONOUGH, S.P., BARR, S.C., DIVERS, T.J., SIMPSON, K.W., MCDONOUGH, P.L., MOHAMMED, H.O. (2002) Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infection and Immunity* 70: 5924-5930.

PALANIAPPAN R.U., CHANG Y.F., CHANG C.F., PAN M.J., YANG C.W., HARPENDING P., MCDONOUGH S.P., DUBOVI E., DIVERS T., QU J., ROE B. (2005). Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Molecular and Cellular Probes*. 19(2): 111-117.

PALANIAPPAN R.U., CHANG Y.F., HASSAN F., MCDONOUGH S.P., POUGH M., BARR S.C., SIMPSON K.W., MOHAMMED H.O., SHIN S., MCDONOUGH P., ZUERNER R.L., QU J., ROE B. (2004). Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *Journal of Medical Microbiology*. Oct;53(Pt 10):975-84.

PALANIAPPAN R.U., MCDONOUGH S.P., DIVERS T.J., CHEN C.S., PAN M.J., MATSUMOTO M., CHANG Y.F. (2006). Immunoprotection of Recombinant Leptospiral Immunoglobulin-Like Protein A against *Leptospira interrogans* Serovar Pomona Infection. *Infection and immunity* 74(3): 1745-1750.

RAMADASS, P., JARVIS, B.D.W., CORNER, R.J., PENNY, D., AND MARSHALL R.B. (1992) Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. International Journal of Systematics and Bacteriology. 42: 215-219

REN, S.X., FU, G., JIANG, X.G., *et al.* (2003). Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. Nature 422: 888-893.

SAMBROOK J. and RUSSEL D.W. Molecular cloning – A laboratory manual. 3.ed. New York: Spring Harbour, 2001.

SHANG, E.S., SUMMERS, T.A., AND HAAKE, D.A. (1996). Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. Infection and Immunity. 64: 2322-2330.

TARR, C.L., AND WHITTAM, T.S. (2002). Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 184: 479-487.

THOMAS, D.D., AND HIGBIE, L.M. (1990) *In vitro* association of leptospires with host cells. Infection and Immunity 58: 581-585.

TOWERS, R.J., FAGAN, P.K., TALAY, S.R., CURRIE, B.J., SRIPRAKASH, K.S., WALKER, M.J., CHHATWAL, G.S. (2003). Evolution of *sfbI* encoding streptococcal fibronectin-binding protein I: Horizontal genetic transfer and gene mosaic structure. Journal of Clinical Microbiology. 41: 5398-5406.

TRUEBA, G.A., BOLIN, C.A., AND ZUERNER, R.L. (1992). Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. Journal of Bacteriology 174: 4761-4768.

TSUCHIMOTO, M., NIIKURA, M., ONO, E., KIDA, H., AND YANAGAWA, R. (1984) Leptospiral attachment to cultured cells. Zentralbi Bakteriell Mikrobiol Hyg [a] 258: 268-274.

VINH, T., FAINE, S., AND ADLER, B. (1984) Adhesion of Leptospires to mouse fibroblasts (L929) and its enhancement by specific antibody. Journal of Medical Microbiology 18: 73-85.

WOESE, C.R. (2000) Interpreting the universal phylogenetic tree. PNAS. 97: 8392-8396.

YURI, K., TAKAMOTO, Y., OKADA, M., HIRAMUNE, T., KIKUCHI, N., AND YANAGAWA, R. (1993). Chemotaxis of leptospires to hemoglobin in relation to virulence. Infection and Immunity 61: 2270-2272.

ZHANG, W.L., KÖHLER, B., OSWALD, E., BEUTIN, L., KARCH, H., MORABITO, S., CAPRIOLI, A., SUERBAUM, S., AND SCHMIDT, H. (2002). Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology 40: 4486-4492.

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

C416c Cerqueira, Gustavo Maia de

Caracterização de *Leptospira* spp. quanto à presença e conservação dos genes da família lig : alvos potenciais para utilização em vacina e testes de diagnóstico / Gustavo Maia de Cerqueira ; orientador Odir Antônio Dellagostin. – Pelotas, 2006. – 52f. : il. color. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2006.

1.Biotecnologia. 2.Leptospirose. 3.Sequenciamento.
4.Vacina. 5.Diagnóstico. I.Dellagostin, Odir Antônio. II.Título.

CDD: 614.56