

ANÁLISE DA PRESENÇA DOS GENES *lic 11966*, *lic 13166* e *lic 12575* EM DIFERENTES ESPÉCIES de *Leptospira* spp.

LUCAS, Caroline¹; FAGUNDES, Michel²; HARTLEBEN, Claudia³; DELLAGOSTIN, Odir²; COLLARES, Tiago¹;

SEIXAS, Fabiana¹

¹Laboratório de Genômica Funcional – CDTec/ Biotecnologia – UFPel

²Laboratório de Biologia Molecular- CDTec/ Biotecnologia – UFPel

³Laboratório de Imunohistoquímica- CDTec/ Biotecnologia – UFPel

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900

carol_gl@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de importância global causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (Bharti et al. 2003; Vijayachari et al. 2008). Essa doença, em humanos, possui uma prevalência média anual global de aproximadamente 500.000 casos graves (Vinetz, J. M., 2001; Bharti et al. 2003). Infecções humanas resultam do contato com solo ou água contaminada com urina de animais infectados (Levett, 2001).

O controle e diagnóstico da leptospirose são dificultados pela falta de uma vacina eficaz devido a uma extensa diversidade sorológica entre as espécies de *Leptospira* uma vez que, mais de 260 sorovares já foram descritos (Cerqueira et al. 2009).

A investigação sobre os componentes moleculares utilizados por leptospirosas para estabelecer a infecção permite a identificação de novos fatores de virulência que podem facilitar o desenvolvimento de vacinas e de novos testes de diagnósticos. As bactérias patogênicas estabelecem infecção pela alteração do proteoma em resposta a estímulos ambientais, como a disponibilidade de ferro e a presença de fatores relacionados ao hospedeiro (Azad Eshghi, 2009).

As proteínas LIC 11966, LIC 13166 e LIC 12575 de *Leptospira interrogans*, apresentam diferenças no perfil protéico quando expressas *in vitro* sob condições diferentes: uma reproduzindo as situações convencionais de cultivo e outra apresentando limitações de ferro e presença de soro, simulando as condições observadas *in vivo*. Além disso, estas proteínas possuem sequências muito similares a fatores de virulência encontrados em outros patógenos. A LIC 11966 é similar a uma lipoproteína de membrana externa ErpY, a LIC 13166, a uma coagulase e a LIC 12575 a uma proteína da família TolC (Azad Eshghi, 2009).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar a presença dos genes que codificam para estas proteínas em diferentes cepas de *Leptospira* spp., visando encontrar alvos conservados em diferentes sorovares patogênicos e ausentes em saprófitas, com potencial no desenvolvimento de vacinas recombinantes e de testes diagnósticos.

2. METODOLOGIA

Os isolados de *Leptospira* utilizados neste estudo foram cultivados em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) enriquecidos com 10% EMJH suplemento (Difco Laboratories), por 7-10 dias sob condições aeróbicas a 28°C. As culturas estoque foram mantidas em meio semi-sólido e estocadas com 10% glicerol a -70°C. Após, foi realizada a extração do DNA genômico baseando-se no protocolo adaptado do kit Bacterial Genomic DNA extraction (GE Healthcare®). Um total de 30 mL de cultura de *L. interrogans* foi centrifugado a 14.000 rpm por 20 min a 4°C. Este *pellet* foi ressuspenso em 80 µL de PK buffer (12 mM Tris-HCl pH 8,0, 6 mM EDTA, 0,6% SDS) e foi adicionado 20 µL de proteinase K (20 mg/mL), agitado em vórtex e incubado por 15 min a 55°C. Posteriormente, foi adicionado 7 µL de RNase, incubado por 15 min à temperatura ambiente, seguido da adição de 500 µL de solução de extração, agitado em vórtex novamente e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi transferida para a coluna de cromatografia, centrifugada a 8.000 rpm por 1 min e foi adicionado 500 µL de Wash buffer para uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 3 min. Após, a eluição foi realizada com a adição de 50 µL de tampão TE (Tris-EDTA 100 mM) 1x pré-aquecido a 50°C, centrifugado por 12.000 rpm por 3 min, para obtenção do DNA genômico purificado.

Com a finalidade de verificar a presença dos genes *lic 11966*, *lic 12575* e *lic 13166*, foi realizada PCR utilizando os primers descritos abaixo.

Tabela 1. Sequência dos primers

ORF	Primer F	Primer R	Tamanho do fragmento (pb)
LIC11966	5'-ACTCTCGAGGAA ATCATGAACGCT-3'	5'-ACGGAATTCTTGAG AAGCGTATTC-3'	372
LIC12575	5'-CTCGAGTTAGAAA GTAATTATAACCTTC-3'	5'-CTGCAGATCTAAAT GCGGGATC -3'	1422
LIC13166	5'-CTGCAGGGAAAA AATTGATG-3'	5'-AAGCTTAGGTCTAA CCGAAATC-3'	798

A técnica foi realizada utilizando-se Master MIX PCR (Promega®) e água milli-Q, com volume final de 12 µl, sob as seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, e um ciclo final de extensão a 72°C por 7 min.

Após, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% utilizando-se marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen®).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No experimento realizado foi comprovada a presença dos genes *lic 11966*, *lic 12575* e *lic 13166* nas espécies patogênicas *Leptospira interrogans*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira kirshneri* e *Leptospira santarosai*. Na cepa de *Leptospira biflexa*, que é uma espécie saprófita, nenhum dos genes foi amplificado.

A presença desses genes em espécies patogênicas e a ausência em uma espécie saprófita demonstra que essas proteínas possuem importância no processo de infecção e possuem potencial para serem utilizadas como vacinógenos.

Tabela 2. Análise da presença dos genes em *Leptospira* spp. determinada por PCR.

Número de cepas	Espécies	Genes		
		<i>lic11966</i>	<i>lic12575</i>	<i>lic13166</i>
5	<i>Leptospira interrogans</i>	+	+	+
3	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	+	+	+
2	<i>Leptospira kirshneri</i>	+	+	+
1	<i>Leptospira biflexa</i>	-	-	-
1	<i>Leptospira santorasai</i>	+	+	+

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que os genes se encontram presentes de forma diferenciada entre espécies patogênicas e saprófita, confirmando a hipótese da relação das proteínas LIC 11966, LIC 12575 e LIC 13166 com o estabelecimento da infecção no hospedeiro. Esse estudo inicial trouxe dados positivos, que possibilitam dar continuidade às análises dessas proteínas, visando o desenvolvimento de vacinas recombinantes e de testes de diagnósticos.

5. REFERÊNCIAS

- BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICARDI, J.N.; MATTHIAS, M.A.; DIAZ, M.M.; LOVETT, M.A.; LEVETT, P.N.; GILMAN, R.H.; WILLIG, M.R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J.M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, p.757-771, 2003.
- CERQUEIRA, G.M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p.760-8, 2009.
- ESHGHI, A.; CULLEN, P.A.; COWEN, L.; ZUERNER, R.L.; CAMERON, C.E. Global Proteome Analysis of *Leptospira interrogans*. **Journal of proteome research**, v.8, p. 4564-78, 2009.
- LEVETT, P. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 2, p. 296-326, 2001.
- VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A.P.; SHRIRAM, A.N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **Journal of Biosciences**, v.33, p. 557-569, 2008.
- VINETZ, J.M. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.14, p.527-538, 2001.