



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

PRISCYLA DOS SANTOS RIBEIRO

**BIOFILME DE *Leptospira*: ESTUDO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E
CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO**

SALVADOR - BA

2016

PRISCYLA DOS SANTOS RIBEIRO

**BIOFILME DE *Leptospira*: ESTUDO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E
CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau em Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Paula Carvalhal Lage von B. Ristow

Salvador
Semestre 2 / 2015

Aos meus pais, Soraia e Pedro, meu tio Meirelles, meus irmãos Jorge e João Pedro, minhas avós Marta e Elizabete, exemplos de perseverança e fé.

AGRADECIMENTOS

À Paula Ristow, minha orientadora e amiga, por todos os ensinamentos, dicas, conselhos e incentivos e por acreditar que a pesquisa é possível de ser desenvolvida no Brasil, apesar de tamanha dificuldade.

À Tânia Marques, pelo suporte na organização e construção desse trabalho.

À Suzana Telles da Cunha Lima pelos ensinamentos iniciais na proteômica e por toda ajuda durante os procedimentos de eletroforese e *Western blot* realizados.

À Alessandra Selbach pela gentileza em nos permitir a utilização do Laboratório de Genética e Evolução, LAGEV-IBIO-UFBA.

À Melissa Hanzen pelo apoio laboratorial.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia e Saúde (LABACS) do IBIO – UFBA, por todo apoio e amizade. Em especial à Larissa, pela colaboração durante os experimentos de proteômica e Artur pela colaboração nas análises *in silico*.

Ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM), CPqGM - FIOCRUZ, em especial ao Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, pelo apoio e suporte oferecido para a realização desse trabalho.

À Hugo Naya e equipe do Instituto Pasteur de Montevideo pela colaboração e auxílio no desenvolvimento do trabalho *in silico*.

Ao Instituto de Biologia e à UFBA, local de grande aprendizado e crescimento pessoal e profissional.

*O sucesso nasce do querer, da
determinação e persistência em se chegar a
um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo,
quem busca e vence obstáculos, no mínimo
fará coisas admiráveis.*

José de Alencar

RESUMO

Biofilmes participam na patogênese de importantes doenças infecciosas e são considerados fatores de virulência. Bactérias do gênero *Leptospira* formam biofilmes *in vitro* e em rins de ratos colonizados. Leptospiras patogênicas são o agente da leptospirose, uma zoonose de ampla distribuição mundial. Acredita-se que o biofilme de leptospiras possa ser um mecanismo de virulência durante a infecção crônica e possivelmente permita uma maior sobrevivência dessas bactérias no ambiente. Os mecanismos moleculares envolvidos na formação do biofilme por leptospiras ainda são pouco conhecidos. O objetivo desse trabalho foi analisar *in silico* e *in vitro* os fatores de virulência no biofilme de *Leptospira* e caracterizar o crescimento de *Leptospira biflexa* em biofilme. Para isso, utilizamos três estratégias: (i) busca pelos fatores de virulência de *Leptospira interrogans* e análise *in silico* desses fatores no transcriptoma já conhecido de *Leptospira biflexa*; (ii) avaliação da expressão das proteínas Loa22 e LipL32 utilizando *Western blot*; (iii) caracterização do crescimento de biofilmes de *L. biflexa* realizando curvas de crescimento; (iv) padronização do teste semiquantitativo de formação de biofilmes em tubos de vidro. Identificamos 15 fatores de virulência de *Leptospira interrogans*, sendo que destes, KatE, Mce e HtpG participam na formação de biofilme em outras bactérias. Entre os ortólogos encontrados no genoma de *L. biflexa*, o fator de virulência FlaA2 teve diferença de expressão significativa no transcriptoma de *L. biflexa*. Encontramos que as lipoproteínas LipL32 e Loa22 são expressas durante o biofilme de *Leptospira interrogans*. No entanto, notamos que LipL32 foi mais expressa no biofilme, enquanto que Loa22 foi mais expressa em células planctônicas. Na caracterização do crescimento de biofilme de *L. biflexa*, observamos curvas clássicas de crescimento bacteriano. No teste semiquantitativo de formação de biofilmes em tubos de vidro, após padronização, demonstramos o típico desenvolvimento de biofilme de *L. biflexa*, contendo as fases de adesão, maturação e destacamento. Esperamos com esse trabalho contribuir para o conhecimento de biofilmes de *Leptospira*, da biologia e da patogênese de leptospiras.

ABSTRACT

Biofilms participate in the pathogenesis of important infectious diseases and are considered virulence factors. Bacteria of the genus *Leptospira* form biofilms *in vitro* and in colonized kidneys of rats. Pathogenic leptospires are the causative agent of leptospirosis, a zoonosis of worldwide distribution. It is believed that the biofilm of leptospires can be a virulence mechanism during chronic infection and allow a longer survival of this bacteria in the environment. The molecular mechanisms involved in biofilm formation by leptospires are still poorly understood. The goal of this work was to analyze *in silico* and *in vitro* the virulence factors expressed in *Leptospira* biofilm and to characterize the growth of *Leptospira biflexa* in biofilm. For that, we used three strategies: (i) search for virulence factors of *Leptospira interrogans* and *in silico* analysis of those factors on the transcriptome of *Leptospira biflexa*; (ii) evaluation of the expression of the proteins Loa22 and LipL32 using *Western blot*; (iii) growth curves for characterization of biofilm growth of *L. biflexa*; and (iv) standardization of a semi-quantitative test of biofilm formation in glass tubes. We identified 15 virulence factors of *Leptospira interrogans*, and of these, KatE, Mce and HtpG participate in the formation of biofilm by other bacteria. Among the orthologs found in the genome of *L. biflexa*, the virulence factor FlaA2 had significant expression difference in the transcriptome of *L. biflexa*. We found that the lipoproteins LipL32 and Loa22 are expressed during the biofilm of *L. interrogans*. However, we noticed that LipL32 was more expressed during biofilm and Loa22 was more expressed during planktonic phase. In the characterization of *L. biflexa* biofilm growth, we observed classic growth curves. By the semi-quantitative test of biofilm formation on glass tubes, *L. biflexa* presented a typical biofilm development, with adhesion, maturation and detachment phases. We hope this work will contribute to the knowledge about biofilm, biology and pathogenesis of leptospires.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** *Western blot* de proteínas totais de células planctônicas e biofilme de *Leptospira interrogans* sorovar Lai. Observa-se a expressão das proteínas LipL32 e Loa22pg. 21
- Figura 2.** Análise de expressão proteica diferencial das proteínas LipL32 e Loa22 nos estados de biofilme (superior) e planctônico (inferior) de *Leptospira interrogans*. As áreas demarcadas no gráfico representam os *pixels* relativos às bandas das proteínas obtidas após corrida do gel SDS-PAGEpg. 21
- Figura 3.** Fórmula e valores obtidos do coeficiente de relação (CR) das proteínas LipL32 e Loa22 nos estados de biofilme e planctônicapg. 22
- Figura 4.** Formação de biofilmes de *Leptospira biflexa* em tubos vidro. Os biofilmes foram corados com solução aquosa de cristal violeta 1 %pg. 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores de virulência de *Leptospira interrogans* (patogênica) que possuem ortólogos no genoma de *Leptospira biflexa* (saprófita).....**pg. 18**

Tabela 2. Ortólogos dos fatores de virulência de *Leptospira interrogans* no genoma de *L. biflexa* com diferença de expressão no transcriptoma de *Leptospira biflexa*.....**pg. 19**

Tabela 3. Contagem de células (células/mL) obtidos a partir do experimento 1 de curvas de crescimento de células do biofilme (BIOF), células do sobrenadante do tubo de biofilme (SN) e células planctônicas (PLANC).....**pg. 31**

Tabela 4. Contagem de células (células/mL) obtidos a partir do experimento 2 de curvas de crescimento de células do biofilme (BIOF), células do sobrenadante do tubo de biofilme (SN) e células planctônicas (PLANC)**pg. 32**

Tabela 5. Leituras de absorvância em espectrofotômetro obtidas no primeiro experimento de curvas de crescimento de células do biofilme (BIOF), células do sobrenadante do tubo de biofilme (SN) e células planctônicas (PLANC).....**pg. 34**

Tabela 6. Leituras de absorvância em espectrofotômetro obtidas no segundo experimento de curvas de crescimento de células do biofilme (BIOF), células do sobrenadante do tubo de biofilme (SN) e células planctônicas (PLANC).....**pg. 34**

Tabela 7. Comparação dos valores obtidos na contagem de células planctônicas (PLANC) com aqueles obtidos nas leituras de absorvância em espectrofotômetro dessa amostra**pg. 37**

Tabela 8. Valores de leitura (absorvância a 600 nm) no teste semiquantitativo de biofilme de *Leptospira biflexa*, realizado após coloração com cristal violeta 1% (experimento 1)**pg. 39**

Tabela 9. Valores de leitura (absorvância a 600 nm) no teste semiquantitativo de biofilme de *Leptospira biflexa*, realizado após coloração com cristal violeta 1% (experimento 2)**pg. 39**

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Coeficiente de relação (CR) das proteínas LipL32 e Loa22 nos estados de biofilme e planctônica. Proteínas com valor de CR maior que zero são positivamente expressas no biofilme, enquanto que valores de CR menores que zero são negativamente expressas nesse fenótipo.....**pg. 22**
- Gráfico 2.** Curvas de crescimento de *Leptospira biflexa* oriundas do experimento 1..... **pg. 32**
- Gráfico 3.** Curvas de crescimento de *Leptospira biflexa* oriundas do experimento 2.
.....**pg. 33**
- Gráfico 4.** Curvas de crescimento de BIOF oriundas dos experimentos 1 e 2.....**pg. 33**
- Gráfico 5.** Curvas de crescimento de *Leptospira biflexa* oriundas do experimento 1, de acordo com leitura de absorbância 420 nm.....**pg. 35**
- Gráfico 6.** Curvas de crescimento de *Leptospira biflexa* oriundas do experimento 1, de acordo com leitura de absorbância 600 nm..... **pg. 35**
- Gráfico 7.** Curvas de crescimento de *Leptospira biflexa* oriundas do experimento 2, de acordo com leitura de absorbância 420 nm..... **pg. 36**
- Gráfico 8.** Curvas de crescimento de *Leptospira biflexa* oriundas do experimento 2, de acordo com leitura de absorbância 600 nm.....**pg. 36**
- Gráfico 9.** Teste semiquantitativo da formação de biofilme em tubos por *Leptospira biflexa*, através de coloração com cristal violeta 1% e leitura em espectrofotômetro (experimento 1)**pg. 38**
- Gráfico 10.** Teste semiquantitativo da formação de biofilme em tubos por *Leptospira biflexa*, através de coloração com cristal violeta 1% e leitura em espectrofotômetro (experimento 2)**pg. 39**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Fatores de virulência identificados para *Leptospira interrogans*.....**pg. 17**

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	2
	CAPÍTULO 1: ANÁLISE <i>in silico</i> E <i>in vitro</i> DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE BIOFILME DE <i>Leptospira</i> SPP.	
3.	OBJETIVOS	
	3.1 Geral	10
	3.2 Específico	10
4.	METODOLOGIA	
	4.1 Análise de fatores de virulência de <i>Leptospira</i> envolvidos na formação de biofilme	10
	4.2 <i>Western blot</i> de <i>Leptospira interrogans</i> para avaliação da expressão das proteínas Loa22 e LipI32	12
5.	RESULTADOS	15
6.	DISCUSSÃO	23
	CAPÍTULO 2: PADRONIZAÇÃO DE CURVAS DE CRESCIMENTO E TESTE SEMIQUANTITATIVO DE BIOFILME DE <i>Leptospira biflexa</i>	
7.	OBJETIVOS	
	7.1 Geral	27
	7.2 Específicos	27
8.	METODOLOGIA	
	8.1 Padronização de curvas de crescimento	27
	8.2 Teste semiquantitativo de formação do biofilme de <i>L. biflexa</i>	28
9.	RESULTADOS	29
10.	DISCUSSÃO	40
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
	REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição global causada por bactérias do gênero *Leptospira*. A doença é atualmente considerada um problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento. Apesar de afetar aproximadamente 1.000.000 de pessoas por ano no mundo, essa doença é considerada negligenciada pelas autoridades (COSTA et al., 2015). A incidência da leptospirose é maior nos trópicos do que em regiões temperadas, provavelmente por conta da maior sobrevivência de leptospiras em ambientes quentes e úmidos. Nesses locais, devido a maior ocorrência de chuvas e enchentes, o contato direto ou indireto com a urina liberada por animais infectados com leptospiras patogênicas é facilitado (ADLER, 2014).

Leptospiras são espiroquetas longas, aeróbias obrigatórias, finas e altamente móveis. São bactérias Gram-negativas, possuindo membrana externa na qual lipopolissacarídeos (LPS) estão embebidos (ADLER, 2014). O cultivo dessas bactérias é fastidioso, devido ao longo tempo de geração. As curvas de crescimento seguem o padrão visto em outras bactérias, contendo as fases *lag*, exponencial ou log, estacionária e de declínio (FAINE et al., 1999). *In vitro*, o crescimento de leptospiras depende da adaptação bacteriana ao meio, do inóculo inicial e do tempo de cultivo (CAMERON, 2014).

Leptospiras patogênicas e saprofíticas formam biofilmes *in vitro* (RISTOW et al., 2008). Em estudo posterior com ratos reservatórios naturais cronicamente infectados com *Leptospira interrogans*, identificamos a presença de biofilme renal (SANTOS et al. manuscrito em preparação). É sabido que leptospiras saprofíticas estão presentes em biofilmes mistos formados em unidades hídricas de consultórios dentários (SINGH et al., 2003). Há evidência molecular da participação de leptospiras patogênicas em biofilmes ambientais formados em arrozais (KUMAR et al., 2015a). Os achados da literatura apontam desta forma o biofilme como um fenótipo bastante conservado em leptospiras (RISTOW et al., 2008), com potenciais implicações na patogênese da leptospirose (SANTOS et al. manuscrito em preparação) e na sobrevivência da bactéria no ambiente (KUMAR et al., 2015a). Os biofilmes de *Leptospira* parecem estar associados à infecção

crônica renal (SANTOS et al. manuscrito em preparação), podendo consistir de um mecanismo de sobrevivência do patógeno neste local e de escape do sistema imune .

A virulência de leptospirosas vem sendo estudada desde os anos 2000, com os primeiros estudos de sequenciamento genético (NASCIMENTO et al., 2004) e de mutagênese sítio dirigida em *Leptospira interrogans* (RISTOW et al., 2007). O primeiro fator de virulência geneticamente identificado foi Loa22, uma pequena lipoproteína de membrana externa (RISTOW et al., 2007) que tem função de toxina (ZHANG et al., 2010). Outros fatores de virulência foram posteriormente identificados em *Leptospira*, tais como ClpB e FlaA2 (LAMBERT et al., 2012; LOURDAULT et al., 2011).

Os biofilmes são considerados fatores de virulência em inúmeras patologias, tendo maior relevância em processos infecciosos crônicos (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). Aspectos fenotípicos e moleculares do biofilme de leptospirosas, que ainda são pouco conhecidos (IRAOLA et al., 2016a; RISTOW et al., 2008), quando melhor compreendidos, poderão contribuir para um melhor entendimento da biologia do patógeno, da patogênese da leptospirose e para o desenvolvimento de ferramentas para o controle da infecção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*. A doença foi descrita pela primeira vez em 1886 por Adolph Weil, o qual a caracterizou como icterícia acompanhada por esplenomegalia, disfunção renal e conjuntivite (FAINE et al., 1999). Os principais reservatórios de leptospirosas são os roedores, principalmente o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*), o qual é o principal reservatório urbano no mundo. Leptospirosas colonizam amplamente os rins desses roedores, os quais eliminam o microrganismo através de excreção pela urina (KO et al., 1999). Tais espiroquetas conseguem sobreviver a condições adversas e por longos períodos no ambiente, sendo assim amplamente distribuídas na natureza (BHARTI et

al., 2003). A principal porta de entrada do patógeno em novos hospedeiros é através de abrasões ou cortes na pele ou através de mucosas (LEVETT, 2001).

O homem é um hospedeiro acidental de leptospiros e pode desenvolver formas graves da doença, como a síndrome de Weil, caracterizada por febre, insuficiência renal, insuficiência hepática, com cerca de 15 % de óbitos. Outra forma aguda da leptospirose, porém menos frequente, é a síndrome hemorrágica pulmonar, a qual é caracterizada por insuficiência respiratória e hemorragias, apresentando taxas de letalidade de até 70 % (MACIEL et al., 2008).

A leptospirose tem caráter endêmico no Brasil e em outras regiões do globo, apresentando surtos anuais, principalmente nas épocas chuvosas (COSTA et al., 2015; PICARDEAU et al., 2009). Na Bahia a leptospirose é endêmica, havendo regiões hiperendêmicas na zona urbana de Salvador. Segundo a Secretaria Estadual da Saúde (Sesab), em 2015 (janeiro a junho) a incidência de leptospirose na Bahia foi de 105 casos, com 11 óbitos, enquanto que em 2014, o número de mortes no mesmo período foi de 20, oito a mais do que em 2015. Comparando os dados da Sesab com os dados de precipitação do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), percebemos que os índices pluviométricos no período citado (janeiro a junho) foram elevados em 2015, assim como o número de casos da doença. Esses dados corroboram com a maior incidência da doença nos meses de maior ocorrência de chuvas, o que facilita o contato direto ou indireto com a urina liberada por animais infectados (LEVETT, 2001).

LEPTOSPIRA

Leptospiros (do grego *leptós*, fino, pequeno, delicado e *speira*, espira) pertencem a família *Leptospiraceae* e gênero *Leptospira*. A classificação atual divide o gênero *Leptospira* em espécies patogênicas (causadoras da doença), saprofíticas (ambientais, não causadoras de doença) e intermediárias (de patogenicidade intermediária) (LEVETT, 2015).

Leptospiros são espiroquetas Gram-negativas e com morfologia fina e helicoidal única. São bactérias aeróbias obrigatórias, ubíquas, de crescimento fastidioso e

extremamente móveis (TRABULSI, 2014). Cada *Leptospira* tem dois endoflagelos de inserção periplasmática, o que possibilita realizar movimentos de rotação e translação. Além da importância na motilidade e morfologia bacteriana, os endoflagelos são considerados fatores de virulência (LAMBERT et al., 2012).

CRESCIMENTO BACTERIANO E DE LEPTOSPIRAS

Uma importante característica das bactérias é a forma como estas crescem, sendo esse um processo complexo e que se caracteriza como um somatório de processos metabólicos progressivos seguidos de divisão celular. O crescimento bacteriano é comumente realizado utilizando-se meios líquidos, como o meio EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) utilizado no crescimento de leptospiros (FAINE et al., 1999). O crescimento bacteriano é demonstrado através de uma curva de crescimento, a qual apresenta, em geral, quatro fases: i) *lag* – adaptação ao meio de cultura e intensa atividade metabólica; ii) logarítmica - divisão celular regular e em ritmo acelerado; iii) estacionária - diminuição da taxa de multiplicação e iv) declínio - diminuição do número de microrganismos. A medição do crescimento bacteriano pode ser feita a partir da observação do aumento da quantidade microrganismos utilizando, por exemplo, as técnicas de colorimetria, espectrofotometria, bem como contagem de células, a qual pode ser feita utilizando-se câmaras de contagem, como a câmara de *Petroff-Hausser* (TRABULSI, 2014).

Leptospiros apresentam as fases clássicas de crescimento bacteriano, com tempos de geração variáveis em função do meio de cultura usado; idade, quantidade e fase de crescimento do inóculo; e virulência bacteriana. Espécies saprófitas como *Leptospira biflexa* apresentam tempo de geração médio de quatro (4) horas em cultivos *in vitro*, enquanto que espécies patogênicas, como *Leptospira interrogans*, apresentam tempo de geração médio de seis (6) a oito (8) horas nas mesmas condições (CAMERON; 2014).

BIOFILME

Biofilme é um agregado de microrganismos aderidos a superfícies bióticas ou abióticas e embebidos em uma matriz de exopolissacarídeos altamente hidratada (FLEMMING; WINGENDER, 2010). É considerado o principal modo de vida de procariotos por conferirem proteção contra condições desfavoráveis do ambiente, antibióticos, desinfetantes e sistema imune do hospedeiro (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Biofilmes representam um importante mecanismo de virulência em infecções crônicas como as causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp.* e *Escherichia coli* (BJARNSHOLT et al., 2009). As espiroquetas também formam biofilmes, como *Treponema denticola*, que forma biofilme bacteriano misto na placa dentária (STOODLEY et al., 2004), e *Borrelia burgdorferi*, que forma biofilme no intestino do carrapato vetor da Doença de Lyme (DUNHAM-EMS et al., 2009; SAPI et al., 2012). Também foi descrita a participação do biofilme na colonização de reservatórios animais, como na pulga colonizada por biofilme de *Yersinia pestis*, favorecendo a transmissão da peste bubônica aos hospedeiros (JARRETT et al., 2004).

Descrevemos anteriormente a formação de biofilmes *in vitro* por leptospiros patogênicos e saprofíticos (RISTOW et al., 2008). O biofilme de leptospiros formado *in vitro* é caracterizado por um denso emaranhado bacteriano aderido a um suporte abiótico (vidro ou plástico), na interface ar-líquido (RISTOW et al., 2008). Posteriormente, descrevemos a presença de biofilmes *in vivo* em *Rattus norvegicus* reservatórios naturais da doença cronicamente infectados com *L. interrogans* (SANTOS et al, manuscrito em preparação), indicando que biofilmes podem ter participação na patogênese da leptospirose.

Estudos mostram que leptospiros saprofíticos compõem cerca de 40% de biofilmes mistos formados em unidades hídricas de consultórios dentários (SINGH et al., 2003) e que leptospiros patogênicos estão presentes em biofilmes ambientais formados em arrozais em períodos pós-chuvas (KUMAR et al., 2015a). Também já foi observada a formação de biofilme pela espécie patogênica *L. interrogans* em associação *Azospirillum brasilense* (KUMAR et al., 2015b).

Sabe-se que organismos formadores de biofilme apresentam ampla reprogramação da sua regulação gênica, apresentando um comportamento séssil e produção de polissacarídeos extracelulares de matriz. Ademais, ocorrem mudanças na expressão de moléculas de superfície e fatores de virulência (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009). Devido à importância dos biofilmes em infecções, a expressão desses fatores de virulência tem sido estudada em biofilmes bacterianos. O fator de virulência *dnaJ*, por exemplo, codifica a chaperona DnaJ e faz parte da conservada família das Hsp40 (proteínas de choque térmico de 40 KDa). Esse gene apresenta expressão diferencial no transcriptoma do biofilme de *L. biflexa* (IRAOLA et al., 2016b) e, quando ausente em *Escherichia coli*, leva à inibição da formação do biofilme, mostrando a importância desse gene para o fenótipo (CAI et al., 2013).

PROTEÔMICA DE BIOFILME

Enquanto a análise genômica oferece informações acerca da presença de genes necessários para a formação de biofilmes, técnicas de transcriptômica permitem o estudo da fisiologia, fenótipo, atividade metabólica, e comunicação célula-célula em biofilmes através da análise de expressão gênica a nível transcricional (KARUNAKARAN; MUKHERJEE, 2011). No entanto, a detecção de proteínas nos estudos de biofilmes é necessária, uma vez que são as entidades funcionais da célula. Além disso, devido à existência de regulações a nível pós-transcricional e modificações pós-traducionais em proteínas, análises proteômicas são complementos essenciais às análises de transcriptoma (SAUER, 2003).

Investigações proteômicas de biofilmes bacterianos emergiram rapidamente no início dos anos 2000, evidenciando alterações metabólicas e de resistência celular em comparação a células planctônicas (de vida livre) (KHEMIRI et al., 2015). O desenvolvimento de biofilmes ocorre em eventos sequenciais, com as fases de adesão inicial, multiplicação bacteriana, maturação e destacamento; entretanto, o proteoma bacteriano ainda é pouco explorado durante essas etapas (KHEMIR et al., 2015). Através de eletroforese bidimensional, foi demonstrado que há uma reprogramação de

aproximadamente 35% do proteoma de *Pseudomonas aeruginosa* durante as fases de desenvolvimento de biofilme (SAUER et al., 2002).

Técnicas proteômicas vêm sendo usadas também para a compreensão de mecanismos de virulência de biofilmes (KUBONIWA et al., 2013). Um estudo metaproteômico identificou adesinas, autolisinas, proteases, fatores de virulência e proteínas de resistência a antibióticos em biofilmes mistos de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Fusobacterium nucleatum*, durante infecções endodônticas (KUBONIWA et al., 2013).

Além das técnicas proteômicas tradicionais, abordagens imunoproteômicas têm sido usadas para identificar proteínas imunogênicas expressas em biofilmes (YI et al., 2016). Um estudo realizado com *Streptococcus equi* identificou, através da técnica de *immunoblotting*, 17 proteínas imunorreativas, dentre as quais estava GroEL. Resultados apontaram que essa chaperona, a qual está envolvida no processo de formação de biofilme, pode também estimular a resposta imune, sendo um candidato vacinal em potencial para esta estreptococose (YI et al., 2016).

FATORES DE VIRULÊNCIA

O conhecimento dos genomas de *Leptospira* permitiu a realização de estudos de mutagênese, técnica utilizada por Ristow e colaboradores (2007) na identificação do primeiro fator de virulência, a proteína Loa22. Posteriormente, outros fatores de virulência foram identificados; porém, até o momento nenhum estudo identificou fatores ou mecanismos de virulência relacionados à leptospirose crônica (ADLER, 2014). Alguns fatores de virulência são bem caracterizados em *Leptospira interrogans* e a sua expressão *in vivo* já foi demonstrada em modelos animais (RISTOW et al., 2007).

Devido à importância dos biofilmes em infecções, a expressão de fatores de virulência também tem sido estudada em biofilmes bacterianos (GRUDNIAK; WŁODKOWSKA; WOLSKA, 2015). Muitos estudos envolvendo biofilmes têm como objetivo a prospecção de antígenos e fatores de virulência para fins biotecnológicos. Análises de *western-blot* identificaram cerca de 30 proteínas imunogênicas expressas

em biofilmes de *Staphylococcus aureus*, entre elas: β -lactamases, autolisinas e lipoproteínas (BRADY et al., 2006). Em estudo realizado com *Streptococcus agalactiae*, fatores de virulência componentes do pili conferiram proteção contra infecção em imunização de camundongos (ROSINI; MARGARIT, 2015). O pili é um fator de virulência envolvido na adesão celular e formação do biofilme (ROSINI; MARGARIT, 2015).

JUSTIFICATIVA

O biofilme de *Leptospira* é um fenótipo comum ao gênero, como observado em experimentos *in vitro*. No ambiente, há relatos da participação de leptospiros em biofilmes mistos (Singh et al., 2003; Kumar et al., 2015). Biofilme está presente também nos rins de ratos cronicamente colonizados (SANTOS et al., manuscrito em preparação) e especula-se que possa tratar-se de um fator de virulência ou facilitar a sobrevivência bacteriana neste local. Não conhecemos ainda o papel do biofilme na imunopatogênese da leptospirose, portanto, torna-se importante estudar mecanismos fenotípicos e moleculares associados aos biofilmes.

Quanto aos aspectos fenotípicos, o biofilme de *L. biflexa* já fora caracterizado quanto à sua arquitetura utilizando-se microscopia por contraste de fase e diferentes técnicas de microscopia eletrônica (Ristow et al., 2008). Porém, ainda não conhecemos os padrões de crescimento de leptospiros neste fenótipo *in vitro*. Não sabemos, por exemplo, qual é o tempo de geração de leptospiros no biofilme.

Quanto aos aspectos moleculares, recentemente um amplo estudo de transcriptômica do biofilme maduro (48 horas) e tardio (120 horas) de *L. biflexa* revelou aspectos importantes relacionados à regulação genica e expressão de moléculas estruturais e enzimas neste fenótipo (IRAOLA et al., 2016). No entanto, por *L. biflexa* ser saprofítica, a abordagem dos fatores de virulência neste estudo foi limitada. Tal abordagem é necessária para melhor compreender a importância do biofilme na virulência e patogênese de leptospiros. Não sabemos, por exemplo, se *Leptospira* quando no fenótipo de biofilme mantém a expressão de fatores de virulência e, por conseguinte, mantém a sua virulência.

Através deste trabalho multidisciplinar esperamos contribuir com aspectos fenotípicos e moleculares de biofilmes de leptospiros saprófitas e patogênicas. Estudos moleculares podem contribuir para identificar marcadores de biofilme, os quais poderão tornar-se candidatos para o desenvolvimento de estratégias anti-biofilme ou anti-colonização por leptospiros.

CAPÍTULO 1: ANÁLISE *IN SILICO* E *IN VITRO* DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE BIOFILME DE *Leptospira* SPP.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Buscar fatores de virulência que possam ter participação na formação do biofilme por leptospiros patogênicos.

3.2 Específicos

- a) Buscar na literatura os fatores de virulência de *Leptospira interrogans*;
- b) Buscar na literatura quais dos fatores de virulência de *L. interrogans* participam na formação de biofilme em outras bactérias;
- c) Buscar ortólogos dos fatores de virulência de *L. interrogans* encontrados, no genoma de *L. biflexa* e analisar a expressão transcricional desses ortólogos nos dados previamente gerados no transcriptoma de *L. biflexa*;
- d) Avaliar a expressão *in vitro* das proteínas Loa22 e LipI32 em biofilmes de *Leptospira interrogans* sorovar Lai.

4. METODOLOGIA

4.1 Análise de fatores de virulência de *Leptospira* envolvidos na formação de biofilme

Com o objetivo de identificar nos genomas de *Leptospira* spp. fatores de virulência envolvidos na formação de biofilme, realizamos diferentes abordagens. Inicialmente,

realizamos levantamento bibliográfico e busca manual de fatores de virulência de *Leptospira interrogans*, espécie de *Leptospira* que concentra grande número de sorovares patogênicos (12 sorovares) (LEVETT, 2015). Em seguida, verificamos através de busca na literatura quais dos fatores de virulência de *L. interrogans* têm participação na formação de biofilmes por outras bactérias. De posse destes dados, verificamos se tais genes encontram-se no genoma de *Leptospira biflexa* (saprófita) e analisamos a sua expressão transcricional em dados previamente obtidos de sequenciamento de RNA.

a) Busca na literatura por fatores de virulência de *Leptospira interrogans*:

Realizamos revisão de literatura e busca manual por fatores de virulência de *L. interrogans* através da análise de artigos científicos obtidos na plataforma NCBI *PubMed*. Para isso, utilizamos os seguintes termos de busca: (1) “*virulence factors*” AND “*Leptospira interrogans*” e (2) *virulence* AND “*Leptospira interrogans*”. Organizamos os candidatos encontrados no quadro 1.

b) Busca na literatura por fatores de virulência de *L. interrogans* que participam na formação de biofilme em outras bactérias

A partir dos resultados encontrados em a), fizemos uma busca na literatura na plataforma NCBI *Pubmed* utilizando os seguintes termos: “nome da proteína” AND *biofilm*. Assim, buscamos identificar quais desses fatores de virulência de *L. interrogans* estão envolvidos na formação de biofilme por outras bactérias.

c) Busca por ortólogos dos fatores de virulência de *L. interrogans* no genoma de *L. biflexa*.

Tendo em vista que recentemente o nosso grupo realizou a análise do transcriptoma de *L. biflexa* sorovar Patoc nos estados de biofilme e planctônico, por sequenciamento de RNA mensageiro, em colaboração com a equipe do Dr. Hugo Naya (*Institut Pasteur* de Montevideo) (IRAOLA et al., 2016), uma grande quantidade de

dados foi gerada. Nem todos os dados foram completamente explorados no manuscrito publicado (IRAOLA et al., 2016b).

Desta forma, a partir das proteínas identificadas em a), realizamos um BLASTp (alinhamento dos aminoácidos) contra o genoma de *L. biflexa*. Consideramos apenas os resultados com um *hit* confiável, ou seja, aqueles que preencheram os seguintes parâmetros: (1) *Query cover* (indica a porcentagem da sequência que foi alinhada) próximo de 100%, (2) *E value* (mostra a chance do alinhamento ter acontecido randomicamente) próximo de zero e (3) Identidade (indica quantos resíduos de aminoácidos ocupam a mesma posição no alinhamento) maior que 40%.

Após identificação dos ortólogos, buscamos verificar o seu nível de expressão transcricional nos estados biofilme e planctônico de *L. biflexa* Patoc, nos tempos maduro (48 horas) e tardio (120 horas).

4.2 Western blot de *Leptospira interrogans* para avaliação da expressão das proteínas loa22 e lipI32

a) Cultivos de biofilme e células planctônicas:

Cultivamos *Leptospira interrogans* sorovar Lai cepa 56601 (patogênica) em meio líquido EMJH (Ellinghausen & McCullough, Johnson & Harris) e incubamos a 29 °C em estufa BOD. Para a formação de biofilmes *in vitro*, cultivamos as cepas em tubos de vidro contendo 5 mL de meio de cultura, sem agitação. Através de contagem em câmara de *Petroff-Hausser*, padronizamos os inóculos bacterianos em 10^7 bactérias/mL. Cultivamos as células planctônicas em tubos plásticos tipo Falcon, em agitação a 80 rpm. Calculamos o volume do cultivo planctônico de forma que para cada tubo de vidro (cultivo de biofilme), houvesse 1 mL de cultura planctônica. O tempo de cultivo para obter biofilme maduro (Ristow et al., 2008) para esta cepa foi variável, sendo padronizado no laboratório entre 8 a 12 dias.

b) Obtenção de massa, lise bacteriana e extração proteica

Para obtenção de massa de células planctônicas, dividimos o volume de cultura em tubos tipo *Eppendorf* gelados, contendo 1,5 mL por tubo. Colocamos os tubos no gelo até a utilização. Para obtenção de massa de biofilme, retiramos o meio EMJH do tubo de vidro através de pipetagem. Em seguida, lavamos delicadamente o biofilme formado na parede do tubo utilizando PBS/MgCl₂ gelado com o intuito de retirar células planctônicas. Utilizamos o volume de 6 mL de PBS/MgCl₂ gelado para raspar o biofilme formado, usando uma espátula estéril. Distribuimos a solução contendo o biofilme nos tubos tipo *Eppendorf* gelados. Centrifugamos todos os tubos (células planctônicas e biofilme) por 10 min, a 13.000 rpm e a 4 °C, e descartamos os sobrenadantes.

Utilizando o tampão PBS/MgCl₂ gelado, lavamos os *pellets* obtidos para retirada de soro albumina bovina (BSA) e, em seguida, centrifugamos por 10 min, a 13.000 rpm, a 4 °C e descartamos os sobrenadantes. Para concentração da massa, ressuspendemos cada pellet em 1,5 mL de PBS/MgCl₂ gelado e centrifugamos por 10 min a 13.000 rpm e a 4 °C e descartamos o sobrenadante. Guardamos os pellets a – 80 °C até o seu uso.

Lisamos *L. interrogans* de acordo com protocolo utilizado por Eshghi et al. (2009), usando tampão de lise com as seguintes modificações: 0,1% SDS; 1 mM PMSF e Coquetel inibidor de Protease (Sigma). Em seguida, incubamos as massas bacterianas em gelo durante 1 hora. Após esse período, sonicamos as amostras em três pulsos de 10 segundos com amplitude de 30% e 15 segundos de intervalo (*Sonics Vibra Cell*, modelo CV18). Após a sonicação, centrifugamos as amostras a 13.000 rpm, a 4 °C, durante 20 min. Armazenamos os extratos proteicos em freezer a -80 °C até o seu uso.

c) Quantificação proteica e eletroforese em gel 1D:

Realizamos a quantificação proteica dos extratos totais obtidos por espectrofotometria utilizando o método de *Bradford*, com leitura a 595 nm e comparação com curva padrão de BSA. Submetemos as amostras à eletroforese em gel de 10% de poliacrilamida, a 120 V, por 3h30min e 30 µg de proteína por poço.

d) *Western-blot* para avaliar a expressão de fatores de virulência:

Fizemos a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose (NT) a 100 V e 500 mA por 1h 30min, utilizando o tampão de transferência *Towbin* pH = 8.3 (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol na hora do uso). Lavamos a membrana em água e coramos com solução de Vermelho de *Ponceau* até corar, para checar qualidade da transferência. Em seguida, lavamos a membrana três vezes com água destilada ou até que esta estivesse bem clara.

Bloqueamos a membrana em PBS-leite 5 % por 1 h em agitação lenta, em temperatura ambiente (TA) e em seguida, incubamos essa membrana por 2 h em TA com solução de anticorpo primário diluído em PBS-leite 1%, em agitação lenta. Testamos os seguintes anticorpos primários específicos: Loa22 e LipL32. Em seguida, rinsamos a membrana com PBS-leite 1% e incubamos na solução de anticorpo secundário diluído em PBS-leite 1% por 1 hora, em TA, com leve agitação. Finalmente, lavamos a membrana 5 vezes em PBS-leite 1% e 2 vezes em PBS 1% e colocamos na solução de revelação (solução de 0,3 % de 4 cloro alfa naftol em metanol diluída 5 vezes em PBS 1%, acrescido de 0,33 μ L de H₂O₂/ mL de solução) por cerca de 1 h em TA. Paramos a reação de revelação com água.

Para análise das bandas obtidas na membrana utilizamos o *software ImageJ* da plataforma NIH (<https://imagej.nih.gov/ij/>) e observamos se ocorreram diferenças quantitativas e qualitativas na expressão das proteínas. Esse *software* gera um gráfico com área relativa aos *pixels* de cada banda. Para equalizar os valores obtidos, transformamos as áreas geradas em valor percentual e calculamos um coeficiente de relação entre área da proteína no biofilme *versus* a proteína na planctônica [CR= (Área Biofilme/Área Planctônica) Log₂]. Aplicamos Log de base 2 para tornar equivalente a relação obtida a partir da divisão das porcentagens de área de cada banda proteica. Os valores maiores que zero indicaram expressão aumentada no biofilme, enquanto valores menores que zero indicaram expressão aumentada em culturas planctônicas.

5. RESULTADOS

Estudo *in silico* dos fatores de virulência

BUSCA POR FATORES DE VIRULÊNCIA EM *Leptospira interrogans*

Através da busca manual, identificamos 15 fatores de virulência de *Leptospira interrogans*, os quais se encontram no quadro 1. Após análise da respectiva bibliografia, cabe ressaltar brevemente a metodologia através da qual cada proteína foi considerada fator de virulência (quadro 1), tomando-se como padrão ouro aquelas que preenchem os postulados moleculares de Koch (FALKOW, 1988). A proteína Loa 22 foi considerada fator de virulência após leptospirosas patogênicas terem sua virulência atenuada em modelo animal e restauração parcial da virulência após complementação genética (RISTOW et al., 2007). Cepas mutantes de ClpB também tiveram sua virulência parcialmente restaurada após complementação (LOURDAULT et al., 2011). Já mutantes de *Leptospira* que não expressaram as proteínas Mce, HtpG e ColA tiveram a virulência completamente restaurada após complementação (KASSEGNE et al., 2014; KING et al., 2014; ZHANG et al., 2012).

Já para as proteínas toxinas ChpK e MazF, a verificação da virulência foi feita através da quantificação da expressão proteica (KOMI et al., 2015). Para estudar o papel de LigA e LigB na patogênese da leptospirose, foi realizada a técnica TALE (*Transcription activator-like effectors*) (PAPPAS; PICARDEAU, 2015). A complementação do mutante *lb139* não resultou em restauração da virulência em hamsters (ESHGHI et al., 2014). Os fatores de virulência HemO, FliY, FlaA2 e KatE foram determinados através de técnicas de mutagênese, porém não foram feitos estudos de complementação.

BUSCA PELOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *L. interrogans* QUE TÊM PARTICIPAÇÃO EM BIOFILMES FORMADOS POR OUTRAS BACTÉRIAS:

Dos 15 fatores de virulência identificados para *Leptospira*, encontramos que três participam na formação do biofilme por outros organismos (quadro 1; proteínas em

negrito). São eles: 1) HtpG, uma proteína de choque térmico cujo mutante em *Escherichia coli* não produz biofilme (GRUDNIAK et al., 2013); 2) KatE, uma catalase que durante a formação de biofilme por *E. coli* oferece proteção contra radicais livres (UHLICH et al, 2012) e 3) Mce (*mammalian cell entry*), uma proteína de entrada em células de mamíferos que quando ausente em *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv leva a alterações na formação do biofilme (KLEPP, 2013).

Quadro 1. Fatores de virulência identificados para *Leptospira interrogans* e em negrito aqueles que participam na formação de biofilme em outras bactérias. .

NOME	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO NA PATOGÊNESE	SOROVAR	REFERÊNCIA
Loa22 *	Proteína de membrana externa com um domínio OmpA	Toxina	Lai	(RISTOW et al., 2007; ZHANG et al., 2010)
HemO (LB186)	Heme oxigenase que degrada o grupo heme	Obtenção de ferro	Manilae	(MURRAY et al., 2008)
FliY	Proteína flagelar que controla a direção do motor flagelar	Disseminação	Lai	(LIAO et al., 2009)
ClpB *	Proteína de choque térmico	Resposta ao estresse	Kito	(LOURDAULT et al., 2011)
FlaA2	Proteína flagelar; contribui com motilidade, forma e virulência.	Disseminação	Manilae	(LAMBERT et al., 2012)
KatE	Catalase encontrada no periplasma; aumenta a resistência ao estresse oxidativo.	Resistência a espécies reativas de oxigênio	Pomona, Manilae	(ESHGHI et al., 2012)
Mce **	Adesão e invasão dos macrófagos	Invasão celular	Lai	(ZHANG et al., 2012)
LruA	Lipopoliproteína, modulação das interações celulares com proteínas do sangue.	Desconhecida	Manilae	(ZHANG et al., 2013)
HtpG **	Chaperona de choque térmico	Desconhecida	Manilae	(KING et al., 2013)
ColA **	Colagenase importante na invasão celular	Invasão celular	Lai	(KASSENE et al., 2014)
LB139	Proteína sensora que regula a resposta transcricional	Motilidade e quimiotaxia	Manilae	(ESHGHI et al., 2014)
LigA	Proteínas imunoglobulina- <i>like</i> , adesão celular no hospedeiro.	Desconhecida	Manilae	(PAPPAS; PICARDEAU, 2015)
LigB	Proteínas imunoglobulina- <i>like</i> , adesão celular no hospedeiro.	Desconhecida	Manilae	(PAPPAS; PICARDEAU, 2015)
ChpK	Toxina com possível função na virulência de leptospiros	Desconhecida	<i>a</i>	(KOMI et al., 2015)
MazF	Toxina com possível função na virulência de leptospiros	Desconhecida	<i>a</i>	(KOMI et al., 2015)

* Complementação resultou em recuperação parcial da virulência.

** Complementação resultou em recuperação total da virulência.

^a Presente em dez cepas das espécies patogênicas *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. weilii*.

Em negrito: fatores de virulência de *L. interrogans* que têm participação em biofilmes formados por outras bactérias.

ANÁLISE DE ORTOLOGIA:

Na busca por ortólogos dos fatores de virulência de *Leptospira interrogans* no genoma de *L. biflexa*, identificamos sete ortólogos (Tabela 1).

Tabela 1. Fatores de virulência de *Leptospira interrogans* (patogênica) que possuem ortólogos no genoma de *Leptospira biflexa* (saprófita)

Proteína	Função	Número de acesso	Query cover	E value	Identidade
Loa22	Proteína de membrana	WP_012390072.1	95%	1e-63	56%
FliY	Proteína flagelar FliN	WP_012389494.1	99%	9e-126	50%
ClpB	Chaperona ClpB	WP_012389399.1	97%	0	42%
FlaA2	Filamento flagelar	ABZ98428.1	97%	5e-126	70%
Mce	Transportador do tipo ABC	WP_012388849.1	97%	9e-102	61%
HtpG	Chaperona HtpG	WP_012476486.1	100%	0	65%
ChpK	Proteína hipotética	WP_012389990.1	100%	6e-46	62%

ANÁLISE DA EXPRESSÃO TRANSCRICIONAL DOS ORTÓLOGOS IDENTIFICADOS NO TRANSCRIPTOMA DE *L. biflexa*:

Dentre os sete fatores de virulência com ortólogos no genoma de *L. biflexa* (Tabela 1), identificamos que FliY, ClpB e FlaA2 são transcritos em *L. biflexa*. No estudo de Iraola e colaboradores (2016), quatro situações biológicas foram confrontadas: a) Biofilme 120 horas X Biofilme 48 horas → **BIOF_120x48**; b) Células planctônicas 120 horas X Células planctônicas em 48 horas → **PLANC_120x48**, c) Biofilme em 48 horas X Células planctônicas 48 horas → **BIOFxPLANC_48** e d) Biofilme 120 horas X Células planctônicas em 120 horas → **BIOFxPLANC_48**. Transcritos que apresentaram expressão diferencial significativa obtiveram valor de FDR (*False Discovery Rate*) mínimo igual a 1^{-2} . De acordo com o valor de logFC (*fold change*), foi avaliado se a diferença de expressão foi positiva (maior expressão do transcrito) ou negativa (menor expressão do transcrito) (IRAOLA et al., 2016). Com base nos parâmetros descritos, apenas *flaA2* teve diferença significativa,

enquanto FliY e ClpB foram transcritos, porém não teve diferenças significativas de expressão (Tabela 2).

Tabela 2: Ortólogos dos fatores de virulência de *L. interrogans* no genoma de *L. biflexa* com diferença de expressão no transcriptoma de *L. biflexa*.

	FliY		ClpB		FlaA2	
	FDR	logFC	FDR	logFC	FDR	logFC
BIOF_120x48	0.032	-0.205	0.66	-0.064	<u>0.0000373</u>	<u>-0.506</u>
PLANC_120x48	0.928	0.014	0.711	0.051	0.227	-0.181
BIOFxPLANC_48	0.019	0.245	0.258	0.147	0.017	0,328
BIOFxPLANC_120	0.868	0.026	0.848	0.031	0.991	0.002

Avaliação da expressão *in vitro* das proteínas loa22 e lipl32

EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS LOA22 E LIPL32 NO BIOFILME DE *L. interrogans*:

Nos experimentos desenvolvidos, utilizamos os anticorpos anti-LipL32 e anti-Loa22, que são importantes lipoproteínas expressas por leptospiros. A análise proteômica revelou a expressão das proteínas LipL32 e Loa22 no biofilme (Figura 1). Este experimento foi realizado 1 vez. A análise de expressão diferencial mostrou haver maior área de pixels para LipL32 em biofilme, enquanto que Loa22 teve maior área na condição planctônica (Figura 2).

A análise da relação existente entre as proteínas nos estados de biofilme e planctônica mostrou que LipL32 teve CR = 0,7, sendo positivamente expressa no biofilme. Já Loa22 teve CR = - 1,1, sendo foi negativamente expressa durante esse fenótipo (Figura 3 e Gráfico 1).

Em um segundo experimento, confirmamos a expressão dessas proteínas nos estados de biofilme e planctônico de *Leptospira interrogans* (dados não demonstrados), porém não foi possível realizar a análise da expressão diferencial uma vez que o *software* utilizado (*ImageJ*) não conseguiu ler as bandas obtidas que estavam bastante claras. Observamos também que essas proteínas não foram expressas no biofilme de *L. biflexa*, como já era esperado (RISTOW et al., 2007; MURRAY, 2013) (dados não demonstrados).

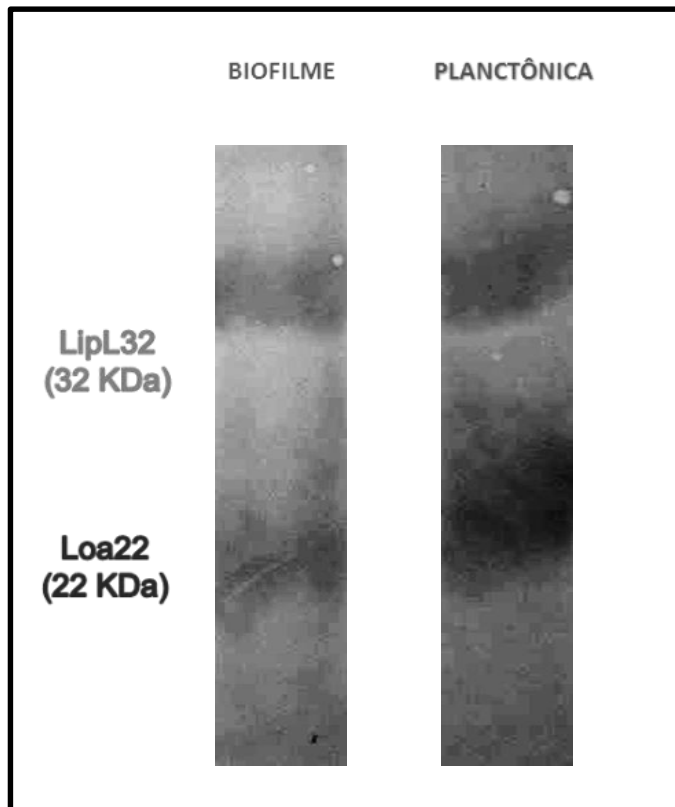


Figura 1. *Western blot* de proteínas totais de células planctônicas e biofilme de *Leptospira interrogans* sorovar Lai. Observa-se a expressão das proteínas LipL32 e Loa22.

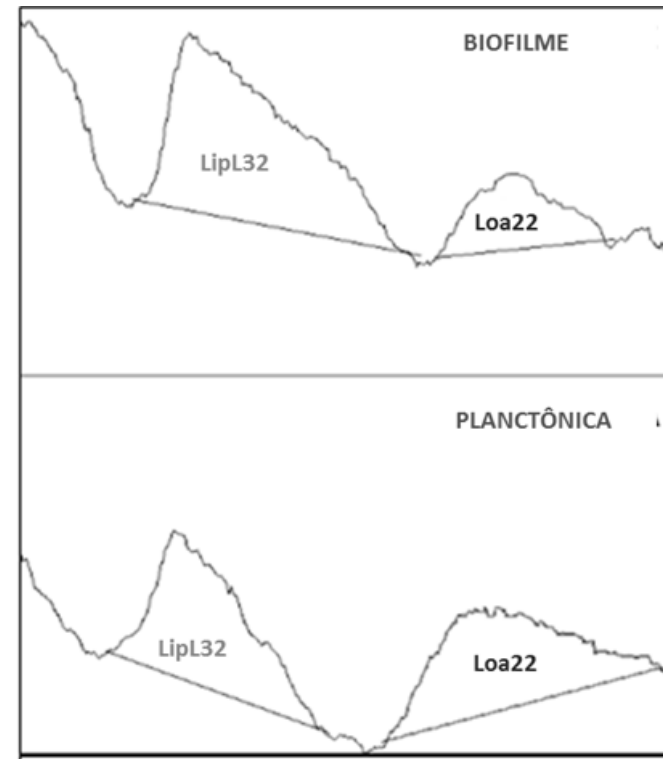


Figura 2. Análise de expressão proteica diferencial das proteínas LipL32 e Loa22 nos estados de biofilme (superior) e planctônico (inferior) de *Leptospira interrogans*. As áreas demarcadas no gráfico representam os pixels relativos às bandas das proteínas obtidas após corrida do gel SDS-PAGE.

Proteína	Biofilme/Planctônica	Coefficiente de relação (CR)
LipL32	1.630159601	0.705013219
Loa22	0.46422231	-1.107112235

Figura 3. Fórmula e valores obtidos do coeficiente de relação (CR) das proteínas LipL32 e Loa22 nos estados de biofilme e planctônica.

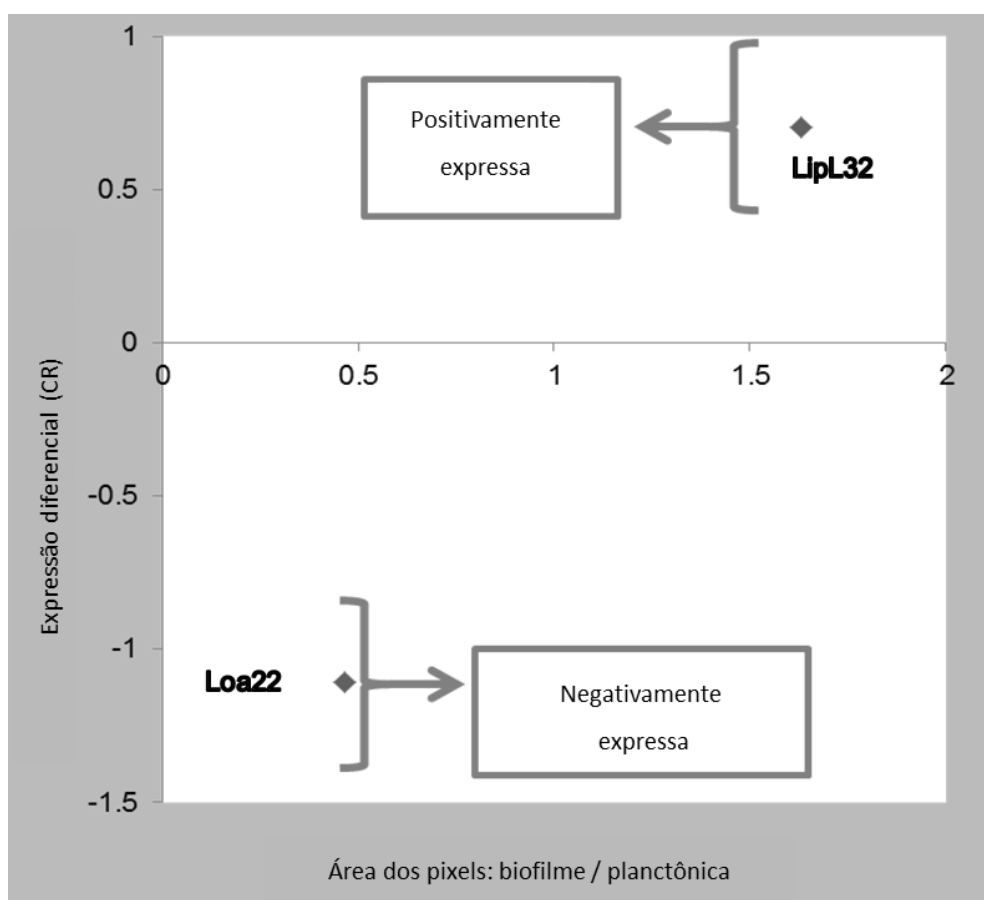


Gráfico 1. Coeficiente de relação (CR) das proteínas LipL32 e Loa22 nos estados de biofilme e planctônica. Proteínas com valor de CR maior que zero são positivamente expressas no biofilme, enquanto que valores de CR menores que zero são negativamente expressas nesse fenótipo.

DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo identificar se genes de virulência e fatores de virulência estão envolvidos no fenótipo de biofilme de *Leptospira*. Tal abordagem é necessária para melhor compreender a importância do biofilme na virulência e patogênese de leptospiros. Por outro lado, não sabemos se *Leptospira*, quando no fenótipo de biofilme, mantém a expressão de fatores de virulência e, por conseguinte, mantém a sua virulência. Visto que os biofilmes de *Leptospira* estão associados à colonização crônica renal (SANTOS et al., manuscrito em preparação), é factível estudar se cepas formadoras de biofilme mantêm os mesmos padrões de virulência.

Em uma primeira abordagem identificamos 15 fatores virulência de *L. interrogans*, comprovados ou putativos. Dentre estes, identificamos que três participam na formação de biofilmes em outros gêneros bacterianos. A proteína de choque térmico HtpG é essencial para a virulência de leptospiros (KING et al., 2014). É homóloga a uma chaperona molecular de 90 KDa e é importante para a resposta ao estresse em diversas bactérias (KING et al., 2014). Estudos feitos com *E. coli* mostraram que, em altas temperaturas, o mutante $\Delta htpG$ teve redução na massa de biofilme aderido à superfície, indicando papel dessa chaperona na formação do biofilme (GRUDNIAK et al., 2013).

A catalase KatE, um fator de virulência essencial de *Leptospira interrogans* sorovares Pomona e Manilae (ESHGHI et al., 2012), também participa no biofilme formado por *E. coli*, onde protege as células no biofilme maduro (72 horas) contra a ação de radicais livres (UHLICH et al., 2012). Encontrar este gene em *Leptospira interrogans* sugere que o mesmo possa desempenhar papel semelhante na formação de biofilme e sobrevivência de leptospiros.

A proteína Mce (*mammalian cell entry*) atua na invasão bacteriana em células de mamíferos (ZHANG et al., 2012). Em *Mycobacterium smegmatis*, o mutante $\Delta 6mce$ (com deleção de seis genes *mce*) foi capaz de produzir biofilme; entretanto, com duas diferenças fenotípicas quando comparado ao biofilme da cepa selvagem: 1) alteração na superfície do biofilme, a qual tornou-se mais lisa e 2) diferença no tempo que o biofilme conseguiu manter sua estrutura na interface ar-líquido sem que se desmanchasse: os mutantes formaram biofilme aderido ao suporte durante 26 dias, enquanto que a cepa selvagem teve o biofilme destacado das paredes do tubo após oito dias (KLEPP, 2013).

Dentre as outras proteínas fatores de virulência identificadas em *L. interrogans*, as proteínas ChpK e MazF fazem parte do sistema toxina-antitoxina de *E. coli*. Tais proteínas inibem a síntese proteica bacteriana através da quebra de RNAs ou causa retardo no crescimento bacteriano e morte (KOMI et al., 2015). Sistemas toxina-antitoxina bacterianos consistem geralmente em dois genes de um operon, sendo que um gene codifica uma toxina, a qual perturba algum processo celular essencial, enquanto que o outro gene codifica uma antitoxina, a qual previne o efeito dessa toxina (WANG; WOOD, 2011). Estudos demonstraram que MaxF e alguns outros genes constituintes desse sistema, como MqsR/MqsA, participam na resposta bacteriana à estresses ambientais iniciando a formação de biofilme (WANG; WOOD, 2011), indicando um possível papel dessa toxina/antitoxina no biofilme de leptospiros patogênicos.

Dentre os fatores de virulência encontrados no genoma de *Leptospira interrogans*, 12 não foram relacionadas diretamente à participação em biofilmes bacterianos (Loa22, HemO, FliY, ClpB, FlaA2, LruA, ColA, LB139, LigA, LigB, ChpK e MazF). Chama a atenção que LipL32 tem propriedades de adesina e, por conseguinte, poderia ter algum papel no biofilme de leptospiros patogênicos. Como essa é uma proteína presente apenas nas espécies patogênicas do gênero *Leptospira* (PINNE; HAAKE, 2013), maiores estudos precisam ser desenvolvidas para que sua função no biofilme seja compreendida. Outro fator de virulência importante é Loa22. Apesar de não ter sido encontrada a relação dessa proteína com o biofilme de em outros organismos, sabe-se que Loa22 é uma proteína *OmpA-like*, ou seja, apresenta o domínio C-terminal ortólogo à proteína de membrana externa OmpA de *E. coli*. Estudos feitos com essa bactéria mostram a participação da OmpA na formação do biofilme por esse patógeno (ORME et al., 2006).

Dos sete fatores de virulência que apresentaram ortólogos no genoma de *L. biflexa*, apenas *flaA2* teve diferença significativa na expressão gênica no transcriptoma. *flaA2* teve menor expressão no biofilme de 120 horas quando comparado ao biofilme de 48 horas (IRAOLA et al., 2016), demonstrando ser importante para a maturação do biofilme de *Leptospira*. O gene *flaA2* compõe o operon *flaA* de *Leptospira* e participa na formação do endoflagelo e na virulência de *L. interrogans* (LAMBERT et al., 2012). Um estudo feito com *Campylobacter jejuni* mostrou a importância dessa proteína flagelar na formação do

biofilme, uma vez que o mutante aflagelar (*flaA*⁻) não formou biofilme durante incubação *in vitro*. Acredita-se que as flagelinas apresentam papel importante no biofilme, uma vez que a motilidade oferecida por essas estruturas são necessárias para que as células formem as microcolônias nos estágios iniciais da formação do biofilme (MOE et al., 2010). Ristow e colaboradores (2008), ao testarem o mutante *flaB*⁻ de *L. biflexa* verificaram retardo de 48 horas na formação do biofilme, indicando que o endoflagelo pode ter papel importante na formação do biofilme.

Nos experimentos de proteômica, nossos resultados, embora ainda preliminares, apontaram para uma mudança de expressão das lipoproteínas LipL32 e Loa22 durante a formação de biofilme por *L. interrogans*. LipL32 é a lipoproteína mais abundante em leptospiros patogênicos, sendo encontrada em aproximadamente 38.000 cópias por célula. Localizada na membrana externa, LipL32 é bastante conservada em espécies patogênicas e intermediárias de *Leptospira* e ausente nas espécies saprofíticas, sugerindo que seja um possível fator de virulência. Apesar de estudos em modelos animais mostrarem que essa proteína não teve função na virulência, o enorme gasto energético de leptospiros para sintetizar tal proteína indica haver importante função para essa molécula (MURRAY, 2013; MURRAY et al., 2009). Ademais, alguns estudos *in vitro* já demonstraram sua atividade como hemolisina e adesina. No entanto, estudos *in vitro* mostraram que apesar de LipL32 ter função de adesina, ela não é essencial à adesão bacteriana à matriz extracelular (HOKE et al., 2008).

Nesse estudo mostramos haver maior expressão de LipL32 durante o biofilme maduro formado por *L. interrogans* serovar Lai 56601 (CR = 0,7). Com base nos resultados obtidos, acreditamos que a função de adesina possa estar relacionada à formação de biofilme por leptospiros patogênicos. Nesse caso, especulamos que LipL32 poderia participar da interação célula-célula que é característica da fase de maturação de biofilmes.

A segunda proteína mais abundante no envelope externo de leptospiros é a lipoproteína Loa22, uma proteína *OmpA-like* de 22 KDa. Loa22 foi o primeiro fator de virulência identificado por mutagênese e análise *in vivo* (RISTOW et al., 2007). Essa importante proteína tem parte de sua estrutura exposta à superfície e provavelmente

interage com proteínas e estruturas da matriz extracelular do hospedeiro. Estudos mostram que proteínas do tipo OmpA têm maior expressão durante o biofilme formado por *Escherichia coli* e facilitam a persistência do biofilme formado por *Acinetobacter baumannii* (CONFER; AYALEW, 2013). Entretanto, encontramos que a OmpA-like Loa22 é menos expressa durante o biofilme maduro de *L. interrogans* Lai 56601 (CR = - 1,1). Acreditamos que devido à sua importante função na virulência de leptospiros, há menor expressão de Loa22 *in vitro*, refletindo na menor expressão durante o biofilme formado em tubos de vidro.

CAPÍTULO 2: PADRONIZAÇÃO DE CURVAS DE CRESCIMENTO E TESTE SEMIQUANTITATIVO DE BIOFILME DE *Leptospira biflexa*

7. OBJETIVOS

7.1 Geral

Padronização de curvas de crescimento e teste semiquantitativo de formação de biofilme de *Leptospira biflexa* (saprófita)

7.2 Específicos

- a) Avaliar o padrão de crescimento de *L. biflexa* nos estados biofilme e planctônico, através de contagem bacteriana.
- b) Avaliar o padrão de crescimento de *L. biflexa* nos estados biofilme e planctônico, através de espectrofotometria.
- c) Padronizar teste semiquantitativo de formação do biofilme de *L. biflexa*.

8. METODOLOGIA

- a) Curvas de crescimento

Leptospira biflexa sorovar Patoc cepa Patoc 1 (saprófita) foi cultivada em meio líquido EMJH (Ellinghausen & McCullough, Johnson & Harris) e incubada a 29 °C em estufa BOD. A cepa foi mantida através de repiques semanais. Biofilmes foram cultivados em tubos de vidro contendo 5 mL de meio de cultura, sem agitação. Células planctônicas foram cultivadas em tubos plásticos tipo Falcon, em agitação a 80 rpm. A partir de cultivos em crescimento exponencial (culturas com aproximadamente 7 dias de incubação e 10^8 células/mL), realizou-se a contagem em câmara de Petroff-Hausser. O inóculo inicial das curvas de crescimento foi de 1×10^5 bactérias/mL. Foram realizados dois experimentos;

o inóculo do primeiro experimento foi proveniente de uma cultura com seis dias de incubação, enquanto que para o segundo experimento, a cultura do inóculo tinha nove dias de incubação.

Os tubos foram cultivados por tempos determinados (pontos de observação da curva), quando foram realizadas contagem bacteriana e leitura em espectrofotômetro para avaliar o crescimento bacteriano.

Em cada tempo de observação, para a contagem de células do biofilme, o sobrenadante do tubo foi retirado delicadamente (para não desfazer o biofilme) através de pipetagem e reservado para posterior análise. O biofilme foi delicadamente lavado com meio EMJH, para retirada de células planctônicas não aderidas ao biofilme. Em seguida, 5 mL de meio EMJH foi adicionado, o biofilme foi raspado e 500 uL desta solução foi usado para a contagem em câmara de Petroff-Hausser. Para as células planctônicas, 500 uL de cultura foi utilizado para realizar a contagem bacteriana. Três amostras foram analisadas: células do biofilme (BIOF), células do sobrenadante do biofilme (SN) e células planctônicas (PLANC). Anotamos os valores para posterior plotagem nos gráficos.

Em paralelo à contagem bacteriana, em cada tempo de observação, realizamos a leitura das amostras em espectrofotômetro a 420 nm e 600 nm. O comprimento de onda de 420 nm é usado rotineiramente em laboratórios que realizam cultivos de leptospiros. Já o comprimento de onda de 600 nm, muito usado para estimar a densidade bacteriana de cocos e bacilos, é pouco usado para estes fins espiroquetas; entretanto, recentemente têm crescido na literatura relatos deste uso (KUMAR et al., 2015a, 2015b). Três amostras foram analisadas: células do biofilme (BIOF), células do sobrenadante do biofilme (SN) e células planctônicas (PLANC). Foram utilizadas cubetas acrílico de 3,5 mL e leitura em espectrofotômetro da marca Edutec. Anotamos os valores para posterior plotagem nos gráficos.

b) Teste semiquantitativo de formação do biofilme de *L. biflexa*

Ristow e colaboradores (2008) padronizaram teste semiquantitativo de formação do biofilme de *L. biflexa* usando placas de poliestireno de 12 poços. No entanto, observamos que leptospiros possuem maior capacidade de formar biofilmes de suportes de vidro (dados não publicados). Desta forma, torna-se importante padronizar este teste em tubos de vidro, amplamente usados no laboratório para o cultivo de biofilmes de *Leptospira*.

Os biofilmes foram crescidos conforme descrito em a). Em seguida, retiramos o meio de cultura sobrenadante (SN), lavamos o biofilme com água destilada para retirada de células planctônicas e deixamos os tubos secarem abertos em fluxo laminar. Em seguida fixamos biofilme na chama do bico de Bunsen. Adicionamos a cada biofilme 6 mL de solução aquosa de cristal violeta 1% por 20 minutos. Removemos o cristal violeta e rinsamos o tubo com água destilada duas vezes para retirada do corante remanescente. Solução de álcool/etanol (v/v 80/20) foi adicionada e absorvância foi lida em 600 nm. Anotamos os valores para posterior plotagem nos gráficos.

9. RESULTADOS

CURVAS DE CRESCIMENTO

Foram realizados dois experimentos independentes, onde o crescimento celular foi avaliado em diferentes tempos, por até 12 dias. As tabelas 2 e 3 apresentam os valores de contagem bacteriana encontrados nos experimentos independentes 1 e 2, respectivamente. Os gráficos 2 e 3 representam as curvas de crescimento dos experimentos 1 e 2, respectivamente.

Em ambos os experimentos, para BIOF, SN e PLANC, a fase *lag* durou aproximadamente 48 horas. A fase logarítmica para BIOF durou aproximadamente 50 horas em ambos os experimentos, quando observamos contagem de até 10^7 para BIOF, valor máximo atingido no ponto de 86 horas no experimento 1 (Tabela 2), quando os valores de densidade óptica (DO) DO_{420} e DO_{600} foram iguais a 0.028 e 0.016 consecutivamente (Tabela 4). Já no experimento 2, a contagem de 10^7 foi atingida com

96 horas (Tabela 3), quando a leitura de DO_{420} foi igual a 0.048 e DO_{600} igual a 0.029 (Tabela 5).

Após a fase logarítmica de BIOF, as células entraram em fase de declínio até que, nos pontos de 308 horas para o experimento 1 e 287 horas para o experimento 2, houve um aumento no número de células (Gráfico 4). Esse aumento da contagem para biofilme no último ponto foi um resultado inesperado, uma vez que interpretamos que a cultura estaria em fase de declínio. Porém, os valores de contagem não tiveram correlação com as leituras de 420 nm ou 600 nm, visto que em ambos os experimentos essas leituras tiveram valores próximos a 0.

A contagem de SN atingiu valor máximo, no experimento 1, de 8.20×10^8 em 308 horas (Tabela 2), quando a OD_{420} foi igual a 0.544 e a OD_{600} foi igual a 0.225 (Tabela 4). Já no experimento 2, o valor máximo atingido foi de 8.75×10^8 (Tabela 3), com OD_{420} igual a 0.607 e OD_{600} igual a 0.264 (Tabela 5). Não foi observada fase de declínio para SN em ambos os experimentos.

Para estimar o crescimento bacteriano nos tubos de vidro, quando há formação de biofilme, fizemos a soma dos valores de contagem de células BIOF com as células SN. Encontramos que a soma BIOF + SN apresenta valores de contagem e leituras de espectrofotometria semelhantes aos valores encontrados para PLANC (Tabelas 2 e 3; Gráficos 2 e 3).

As células planctônicas (PLANC) alcançaram a fase estacionária em aproximadamente 184 h no experimento 2, enquanto que no experimento 1 não foi possível observar essa fase. A fase de declínio ocorreu após 141 horas no experimento 1, mas não foi observada no experimento 2. (Gráficos 2 e 3). O valor máximo atingido por PLANC no experimento 1 foi de 5.3×10^8 em 308 horas (Tabela 2), quando a OD_{420} foi igual a 0.623 e a OD_{600} foi igual a 0.257 (Tabela 4). No experimento 2, o valor máximo foi de 6.38×10^8 em 287 horas (Tabela 3), quando a OD_{420} foi igual a 0.480 e a OD_{600} foi igual a 0.197 (Tabela 5).

Observamos nos pontos iniciais (até 190 h para experimento 1 e até 90 horas para experimento 2) que a cultura planctônica apresentou crescimento mais rápido que o

sobrenadante do biofilme (SN). Após este período, observamos uma inversão, onde as bactérias do SN do tubo de vidro cresceram mais rápido (Gráficos 2 e 3).

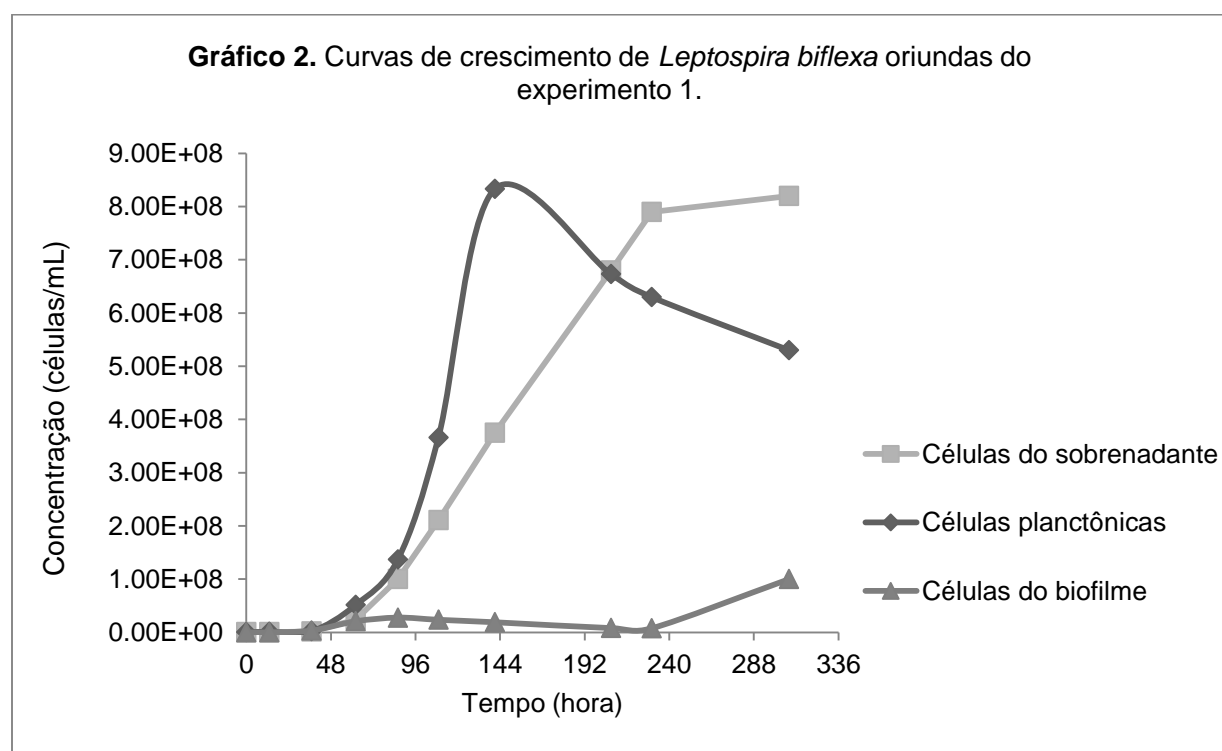
As tabelas 5 e 6 demonstram as leituras em espectrofotômetro realizadas para os experimentos 1 e 2. Os dados obtidos foram plotados em um gráfico de linhas (gráficos 5 e 6). Em ambos os experimentos não foi possível realizar leituras nas primeiras 40 horas. A leitura em 420 nm mostrou-se eficiente em ambos os experimentos (Gráficos 5 e 6), com os valores seguindo o que foi observado na contagem (método direto). Já a leitura em 600 nm não foi precisa no primeiro experimento (Gráfico 5), onde os valores foram diferentes do observado na contagem (Tabela 4 e Gráfico 6). A tabela 6 apresenta valores obtidos para células planctônicas de *L. biflexa* na contagem, Abs 420 nm e Abs 600 nm.

Tabela 3. Contagem de células (células/mL) obtidos a partir do experimento 1 de curvas de crescimento de células do biofilme (BIOF), células do sobrenadante do tubo de biofilme (SN) e células planctônicas (PLANC).

Tempo (hora)	BIOF	SN	BIOF + SN	PLANC
0	0	1.00E+05	1.00E+05	1.00E+05
13	0	5.00E+05	5.00E+05	1.25E+06
37	3.40E+06	1.38E+06	4.78E+06	2.22E+06
62	2.08E+07	2.36E+07	4.44E+07	5.13E+07
86	2.77E+07	1.00E+08	1.28E+08	1.37E+08
109	2.36E+07	2.11E+08	2.35E+08	3.66E+08
141	1.90E+07	3.75E+08	3.94E+08	8.33E+08
207	8.00E+06	6.80E+08	6.88E+08	6.73E+08
230	7.60E+06	7.90E+08	7.98E+08	6.30E+08
308	1.00E+08	8.20E+08	8.20E+08	5.30E+08

Tabela 4. Contagem de células (células/mL) obtidos a partir do experimento 2 de curvas de crescimento de células do biofilme (BIOF), células do sobrenadante do tubo de biofilme (SN) e células planctônicas (PLANC).

Tempo (hora)	BIOF	SN	BIOF + SN	PLANC
0	0	1.00E+05	1.00E+05	1.00E+05
14	4.10E+05	4.10E+05	8.20E+05	6.90E+05
38	4.40E+06	2.00E+06	6.40E+06	4.40E+06
96	1.36E+07	2.80E+08	2.94E+08	3.40E+08
144	9.70E+06	5.90E+08	6.00E+08	4.90E+08
184	6.50E+06	8.05E+08	8.12E+08	6.04E+08
287	1.91E+07	8.75E+08	8.94E+08	6.38E+08



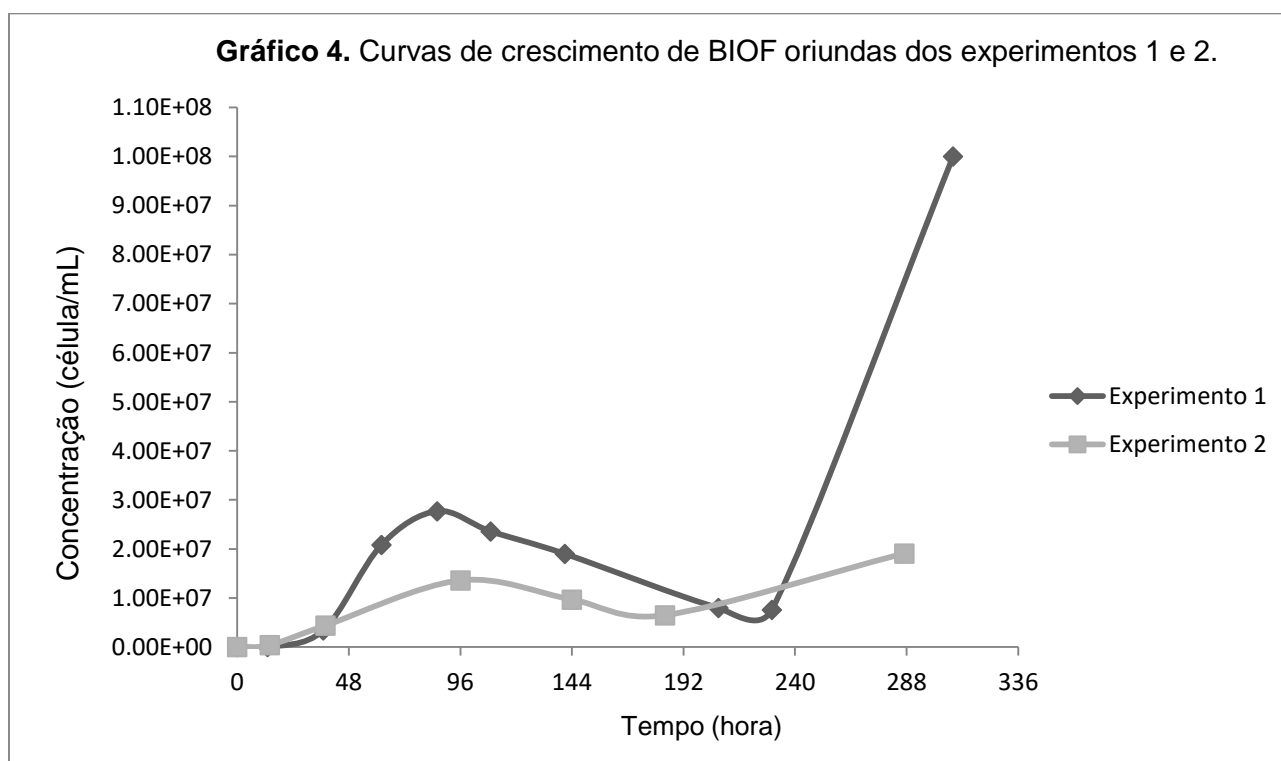
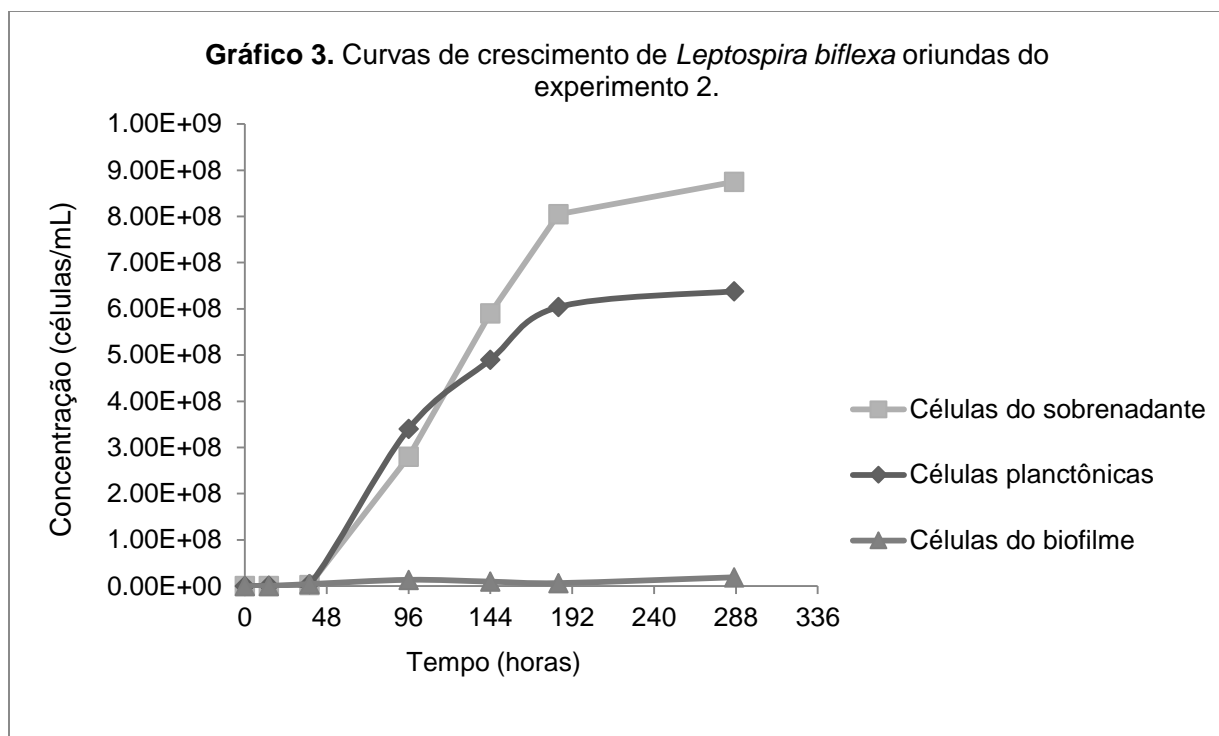
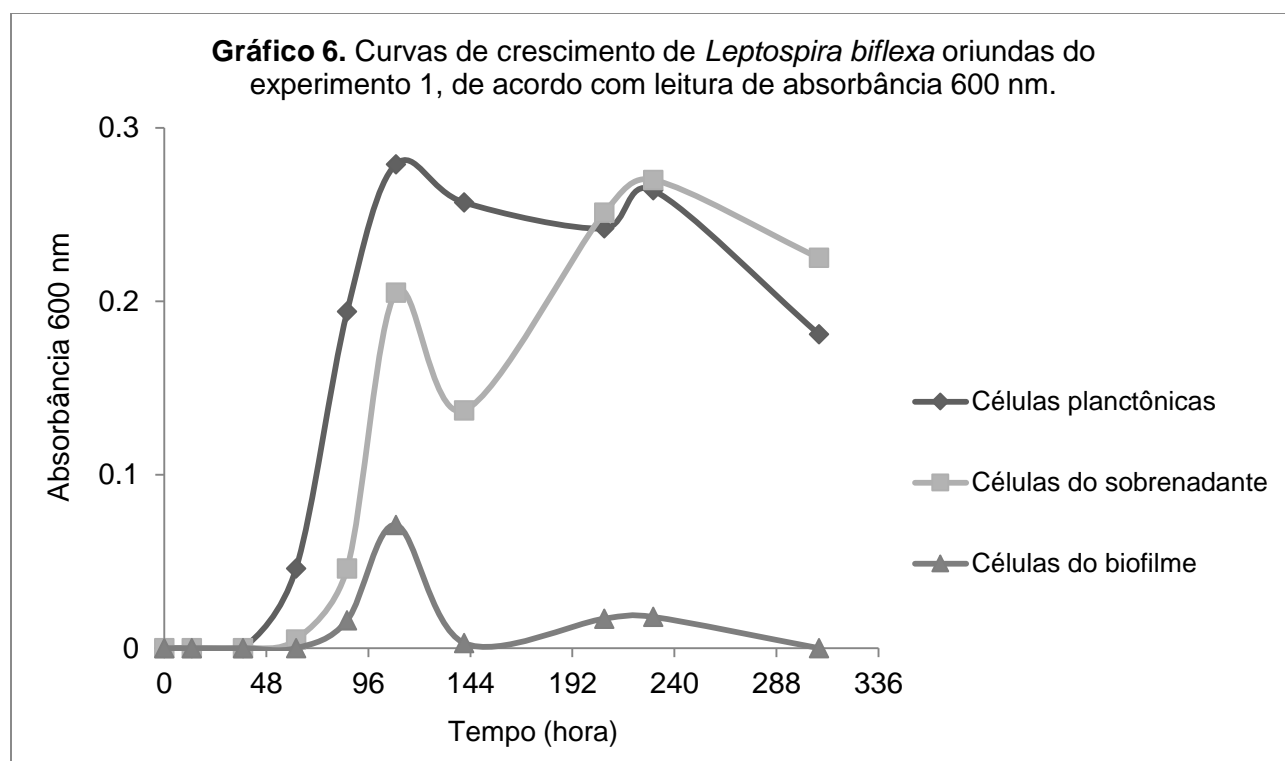
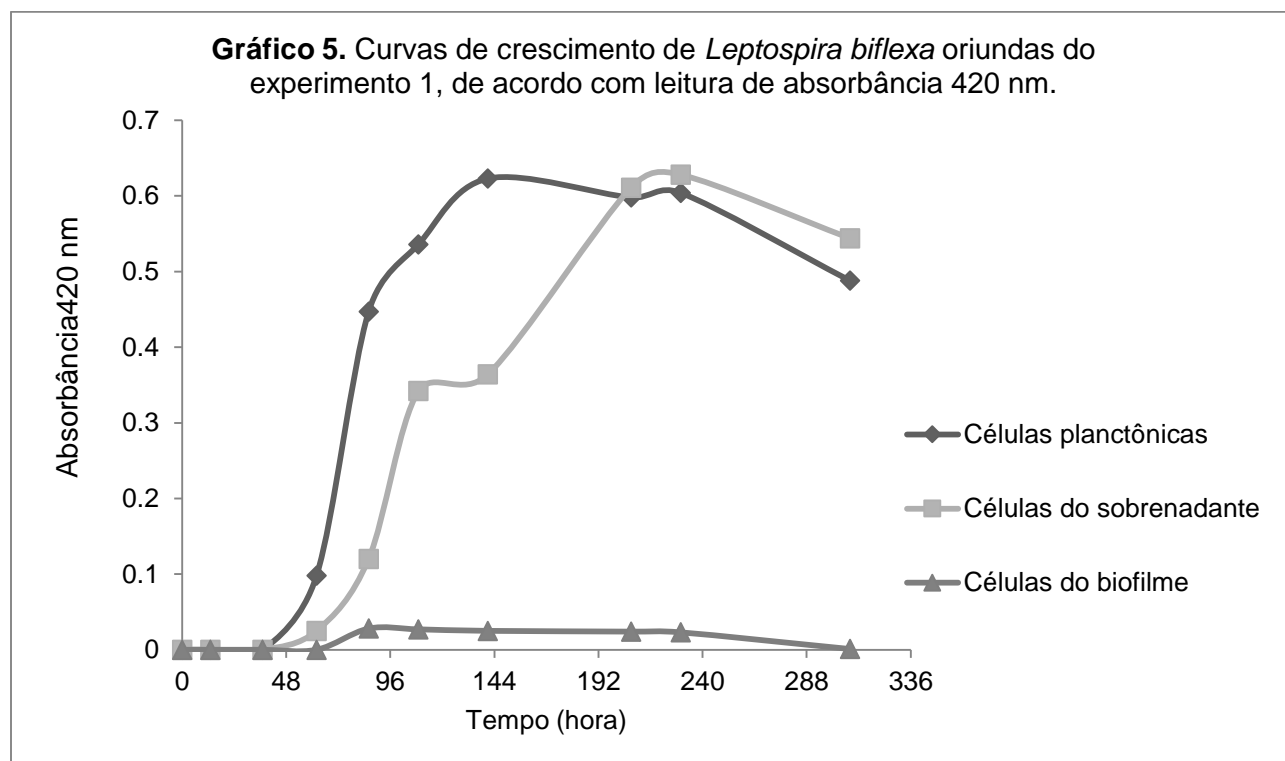


Tabela 5. Leituras de absorvância em espectrofotômetro obtidas no primeiro experimento de curvas de crescimento de células do biofilme (BIOF), células do sobrenadante do tubo de biofilme (SN) e células planctônicas (PLANC).

Tempo (hora)	Leitura a 420 nm			Leitura a 600 nm		
	BIOF	SN	PLANC	BIOF	SN	PLANC
0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0
62	0	0.025	0.098	0	0.005	0.046
86	0.028	0.12	0.447	0.016	0.046	0.194
109	0.027	0.342	0.536	0.071	0.205	0.279
141	0.025	0.364	0.623	0.003	0.137	0.257
207	0.024	0.611	0.598	0.017	0.251	0.242
230	0.023	0.628	0.604	0.018	0.27	0.264
308	0.001	0.544	0.488	0	0.225	0.181

Tabela 6. Leituras de absorvância em espectrofotômetro obtidas no segundo experimento de curvas de crescimento de células do biofilme (BIOF), células do sobrenadante do tubo de biofilme (SN) e células planctônicas (PLANC).

Tempo (hora)	Leitura 420 nm			Leitura 600 nm		
	BIOF	SN	PLANC	BIOF	SN	PLANC
0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0.004	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0
96	0.048	0.316	0.533	0.029	0.136	0.284
144	0	0.654	0.573	0.001	0.285	0.271
184	0	0.656	0.592	0	0.294	0.25
287	0	0.607	0.48	0	0.264	0.197



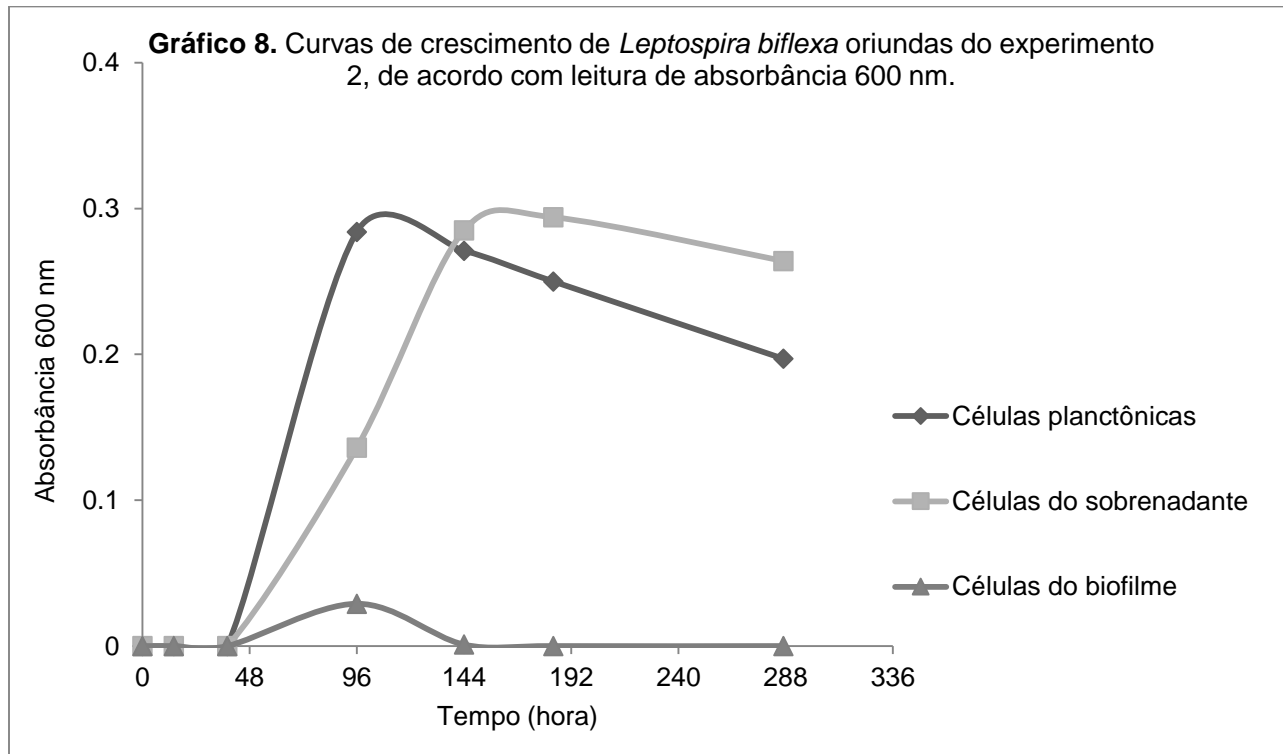
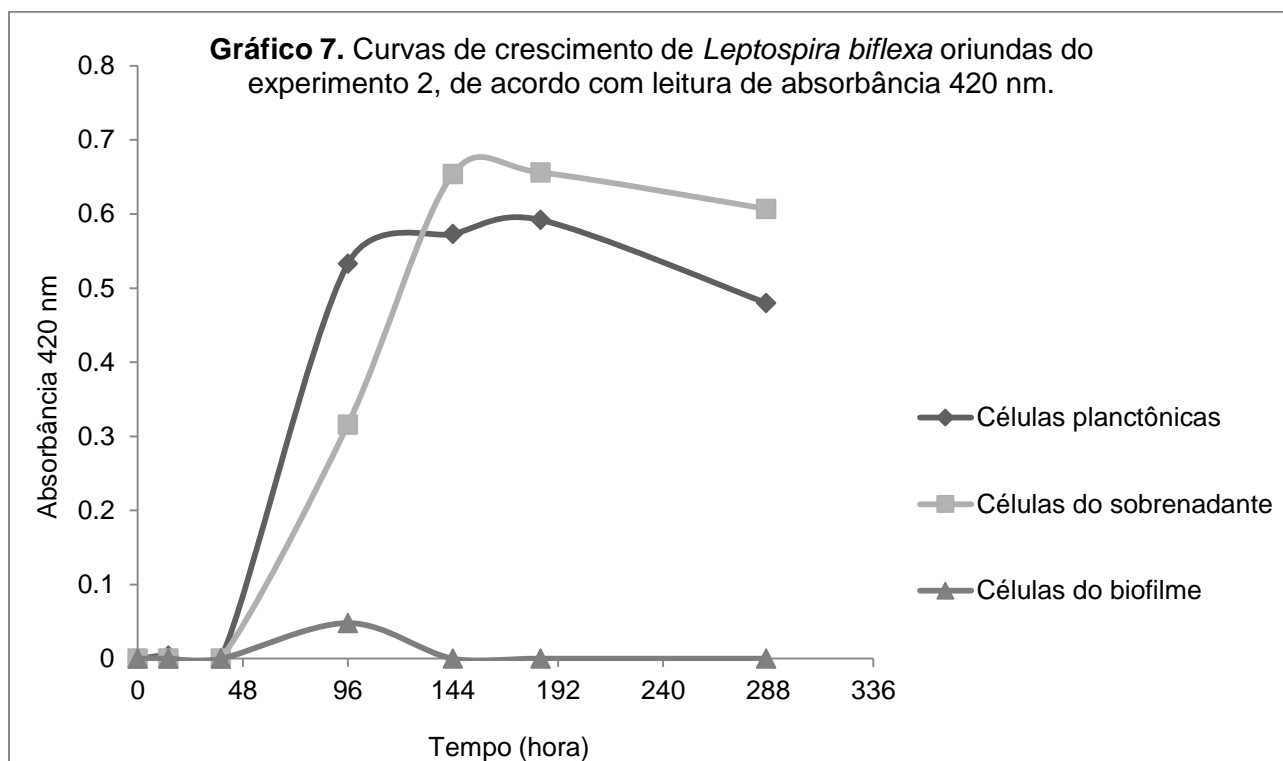


Tabela 7. Comparação dos valores obtidos na contagem de células planctônicas com aqueles obtidos nas leituras de absorvância em espectrofotômetro dessa amostra.

Experimento 1			Experimento 2		
Contagem (células; mL)	420 nm	600 nm	Contagem (células; mL)	420 nm	600 nm
1.00E+05	0	0	6.9E+05	0	0
1.25E+06	0	0	4.40E+06	0	0
5.13E+07	0.098	0.046	Não disponível	-	-
1.37E+08	0.447	0.194	Não disponível	-	-
3.66E+08	0.536	0.279	3.4E+08	0.533	0.284
6.73E+08	0.598	0.242	6.38E+08	0.480	0.197

TESTE SEMIQUANTITATIVO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *L. biflexa*

Foram realizados dois experimentos, onde foi possível observarmos as fases de formação do biofilme: adesão, maturação e destacamento (Figura 4, Gráficos 9 e 10). Observou-se valores máximos de DO_{600} de 0,938 e 0,730 para os tempos de 86 e 96 horas, nos experimentos 1 e 2, respectivamente, mostrando o tempo de formação do biofilme maduro. Nesse ponto, observamos a formação de biofilme mais denso, como observado na figura 4. A leitura de tempos próximos obtiveram valores similares, como o ponto de 37 horas do experimento 1, onde a DO_{600} foi igual a 0.117 (Tabela 6), enquanto no ponto de 38 horas do experimento 2 a DO_{600} foi igual a 0.119 (Tabela 7).

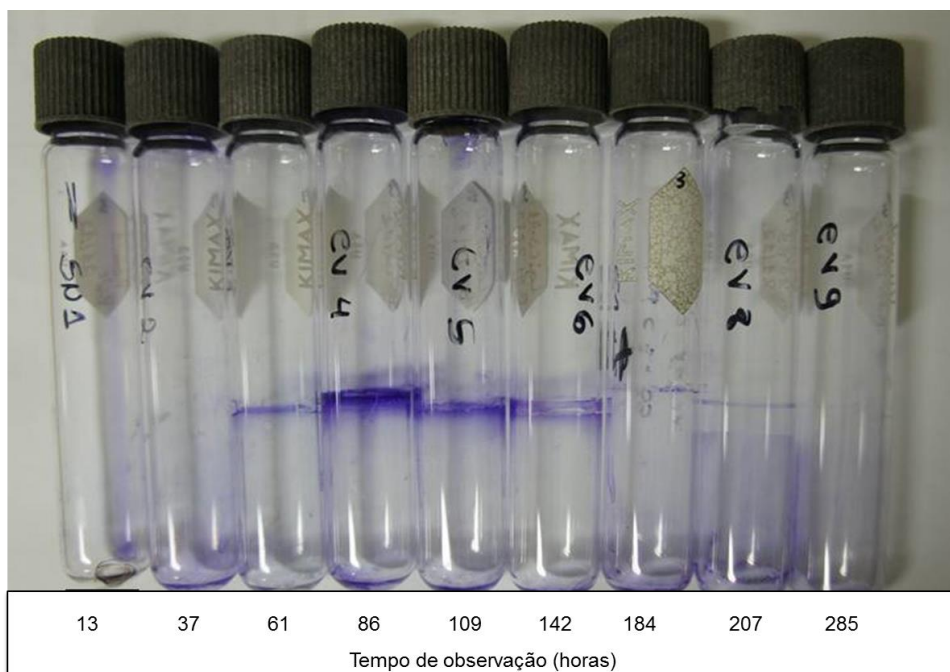
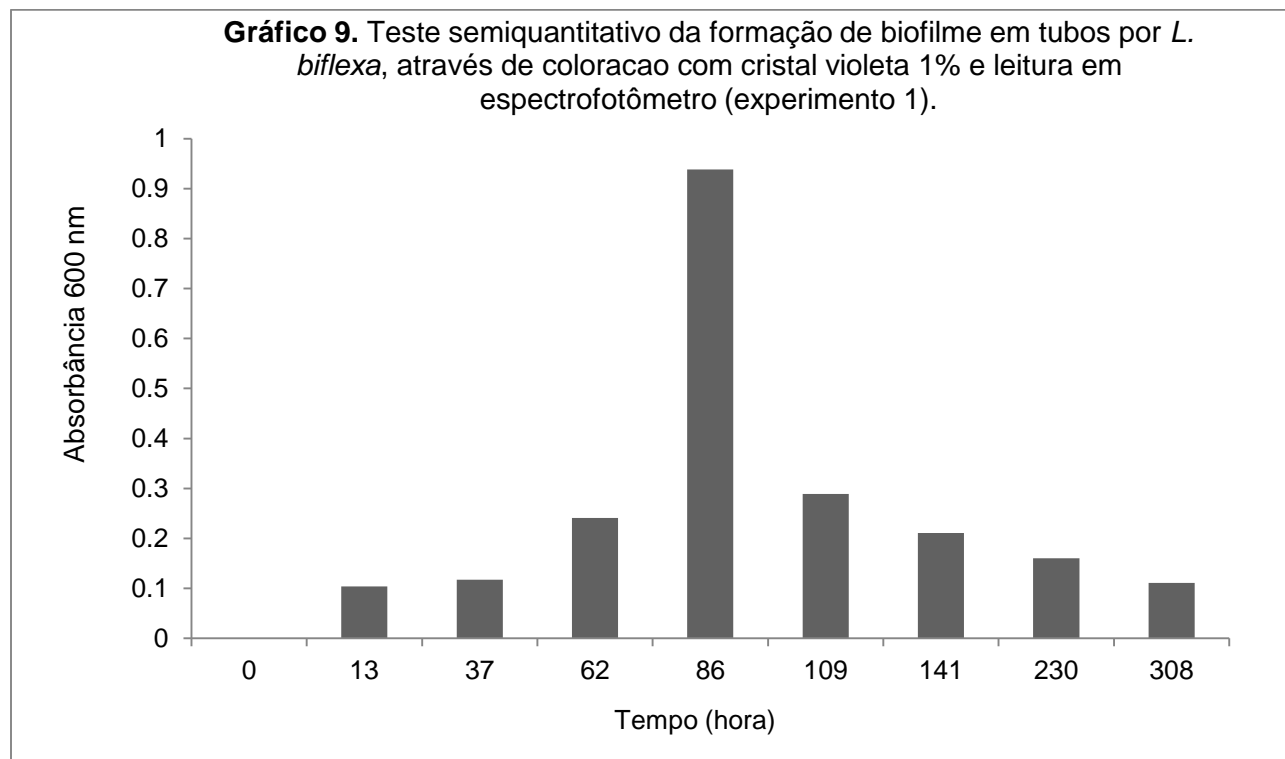
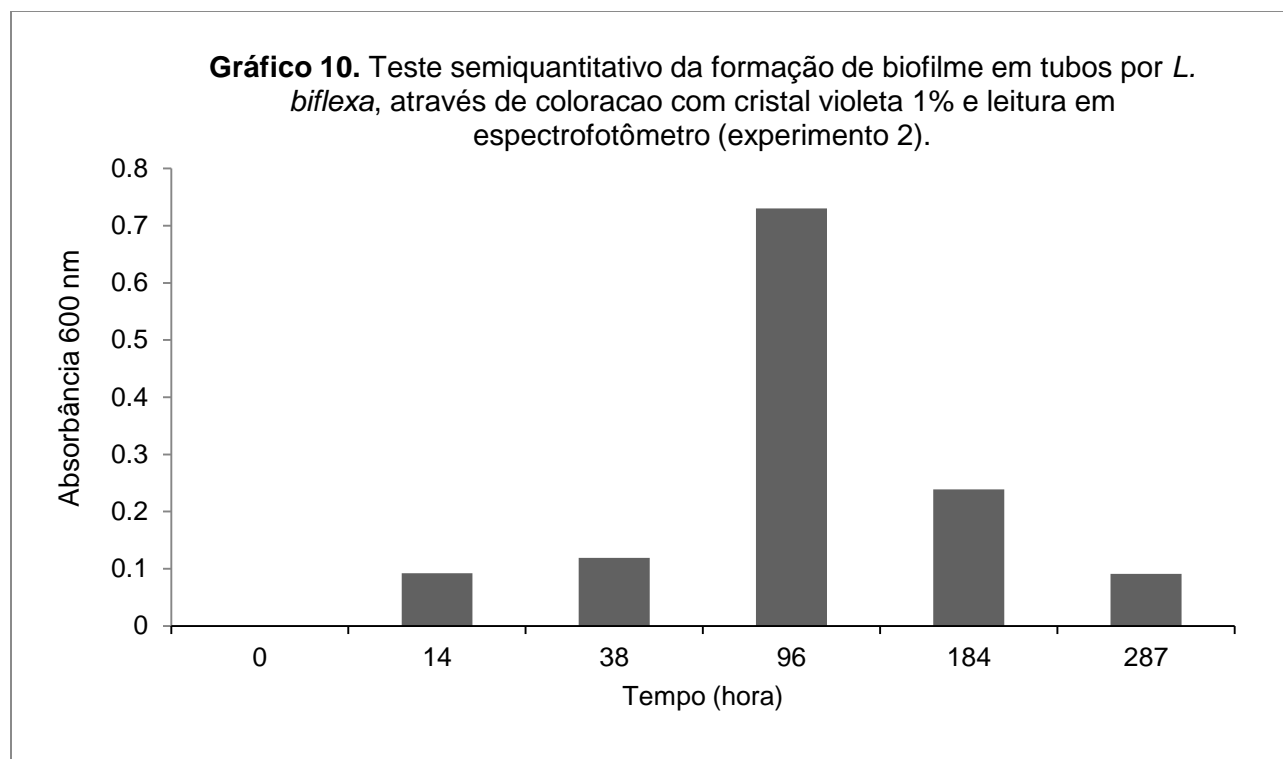


Figura 4. Formação de biofilmes de *Leptospira biflexa* em tubos vidro. Os biofilmes foram corados com solução aquosa de cristal violeta 1 %.





Tempo (hora)	Abs 600 nm
0	0
13	0.104
37	0.117
62	0.241
86	0.938
109	0.289
141	0.211
207	Erro
230	0.160
308	0.111

Tabela 8. Valores de leitura (absorbância a 600 nm) no teste semiquantitativo de biofilme de *L. biflexa*, realizado após coloração com cristal violeta 1% (experimento 1).

Tempo (hora)	Abs 600 nm
0	0
14	0.092
38	0.119
96	0.730
144	Erro
184	0.239
287	0.091

Tabela 9. Valores de leitura (absorbância a 600 nm) no teste semiquantitativo de biofilme de *L. biflexa*, realizado após coloração com cristal violeta 1% (experimento 2).

9. DISCUSSÃO

Embora o biofilme de *L. biflexa* já tenha sido caracterizado (Ristow et al., 2008), ainda não conhecemos os padrões de crescimento de leptospiras neste fenótipo *in vitro*. Observamos nesse experimento que o crescimento celular foi mais lento no biofilme, o que pode ser explicado pelo comportamento altruístico observado nas bactérias, onde o crescimento celular é retardado enquanto que há maximização da produção de biomassa em benefício do biofilme (IRAOLA et al., 2016b). Ademais, genes que codificam as proteínas HepA e Fis, as quais estão associadas ao controle do crescimento em outras bactérias, tiveram regulação negativa no transcriptoma de *L. biflexa* nos biofilmes maduro (48 horas) e tardio (120 horas) (IRAOLA et al., 2016b). A regulação negativa desses genes pode estar relacionada ao retardo no crescimento observado no presente estudo.

O método direto de quantificação celular utilizado nesse trabalho foi a contagem em câmara de Petroff-Hausser. Essa técnica, apesar de ser precisa, é bastante dispendiosa, uma vez que o volume de meio utilizado e o tempo gasto para fazer a contagem são muito altos. Além disso, a contagem exige maior experiência para ser feita, sendo necessário pessoal mais treinado. Uma alternativa para a contagem seria a utilização de métodos indiretos como a leitura em espectrofotômetro. Esse é um método quantitativo indireto onde a leitura de densidade óptica é feita. Apesar de ser bastante útil no laboratório, essa técnica apresenta pouca sensibilidade, a qual é ainda maior em culturas com concentração igual ou menor que 10^8 /mL de leptospiras (FAINE et al., 1999).

Nos experimentos realizados nesse estudo, a leitura em DO_{420} foi observada a partir da concentração de 10^7 leptospiras/mL e 10^8 leptospiras/mL no primeiro e no segundo experimento, respectivamente. Quando a concentração foi abaixo de 10^8 , os valores foram muito baixos, próximos à zero, enquanto que leituras confiáveis foram observadas em culturas com densidade a partir de 10^8 , o que corrobora com os dados previamente descritos na literatura (FAINE et al., 1999). Já para 600 nm, observamos maior variabilidade nas leituras. Artigos recentes de Kumar e colaboradores (KUMAR et al.,

2015b, 2016) apontam o uso de leitura a 600 nm. Porém, na nossa experiência o uso desta faixa de absorbância parece ter pouca valia, não sendo recomendada.

O teste semiquantitativo para quantificação do biofilme de *L. biflexa* mostrou-se, como esperado, ser um método eficiente, como já havia sido demonstrado por Ristow e colaboradores em 2008. A padronização desse método em tubos de vidro representa uma estratégia de quantificação para os experimentos realizados no laboratório, sendo utilizado, por exemplo, para caracterização da formação de biofilme por mutantes ou por cepas recentemente isoladas. O teste em tubos é mais vantajoso de se realizar em comparação com o teste em placas de poliestireno de 12 poços, uma vez que leptospiros preferem o suporte de vidro para formação de biofilmes e uma ampla gama de espécies e cepas forma biofilme neste suporte. Já em placas de poliestireno, observamos que *L. interrogans* Lai não forma biofilme (RISTOW et al., 2008). Desta forma, o suporte de vidro é mais adequado para testar diferentes isolados e cepas mutantes, futuramente. Um inconveniente do cultivo em tubo de vidro é o volume de meio de cultivo necessário (3 a 5 ml), bastante maior do que o usada em poços (1 ml). Uma alternativa poderá ser usar tubos de vidro pequenos e com menor volume.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As análises *in silico* mostraram que os fatores de virulência HtpG, KatE e Mce de *Leptospira interrogans* apresentam função em biofilmes formados por outros organismos, indicando uma provável função dessas proteínas também no biofilme de *L. interrogans*.
- Os experimentos de proteômica mostraram expressão diferencial de LipL32 e Loa22 no biofilme de *L. interrogans*, indicando que essas proteínas podem ter funções neste biofilme. Faz-se necessários repetir os experimentos realizados e realizar mais estudos sobre essas proteínas, buscando entender a relação de tais lipoproteínas com o biofilme *Leptospira* spp.
- Nos próximos passos desta pesquisa iremos analisar a expressão de outras proteínas de *Leptospira* em biofilmes: LigA, FlaA1, LigB, LipL31, GroEL e OmpL36. Baseado nos candidatos identificados *in silico*, buscaremos os anticorpos para estas proteínas e testaremos a expressão das mesmas durante o biofilme formado por *L. biflexa* e *L. interrogans*. Dessa forma, será possível confirmar os resultados obtidos na transcriptômica (IRAOLA et al., 2016b), além de elucidar os mecanismos moleculares de formação de biofilmes de *Leptospira*.
- A realização das curvas de crescimento permitiu verificar que as células nos biofilmes crescem numa taxa menor em relação a planctônica, corroborando com os resultados encontrados por Iraola e colaboradores, 2016, onde genes com papel no crescimento celular tiveram regulação negativa durante o biofilme maduro e tardio.
- A padronização do teste semiquantitativo para a produção de biofilmes permitiu verificar as diferentes fases de produção de biofilmes *in vitro* em suporte de tubo de vidro. Esperamos usar este teste para caracterizar a formação de biofilme por mutantes de *Leptospira* em genes como Loa22 e LipL32, bem como para caracterizar a formação de biofilme de cepas isoladas de reservatórios ou pacientes. Dessa forma, será possível caracterizar, *in vitro*, os diversos biofilmes formados por *Leptospira* spp..

REFERÊNCIAS

- ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 3-4, p. 353–358, 2014.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003.
- BJARNSHOLT, T. et al. Pseudomonas aeruginosa biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. **Pediatric pulmonology**, v. 44, n. 6, p. 547–558, 2009.
- BRADY, R. A. et al. Identification of Staphylococcus aureus Proteins Recognized by the Antibody-Mediated Immune Response to a Biofilm Infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3415–3426, 2006.
- CAI, Y. et al. Screening and identification of DnaJ interaction proteins in streptococcus pneumoniae. **Current Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 732–741, 2013.
- CAMERON, C. E.. Leptospiral structure, physiology, and metabolism. *Leptospira and Leptospirosis*. **Springer Berlin Heidelberg**, 2015. 21-41
- CONFER, A. W.; AYALEW, S. The OmpA family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity. **Veterinary Microbiology**, v. 163, n. 3-4, p. 207–222, 2013.
- COSTA, F. et al. Patterns in Leptospira Shedding in Norway Rats (Rattus norvegicus) from Brazilian Slum Communities at High Risk of Disease Transmission. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003819, 2015.
- DUNHAM-EMS, S. M. et al. Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of Borrelia burgdorferi within ticks. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 12, p. 3652–3665, 2009.
- ESHGHI, A. et al. Leptospira interrogans catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 11, p. 3892–3899, 2012.
- ESHGHI, A. et al. A putative regulatory genetic locus modulates virulence in the pathogen Leptospira interrogans. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 6, p. 2542–2552, 2014.
- FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. Second ed. Melbourne, Australia.: MediSci, 1999.
- FIGUEIRA, C. P. et al. The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence. v. 3, n. 7, 2007.
- FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–33, 2010a.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010b.

GRUDNIAK, A. M. et al. Physiological consequences of mutations in the htpG heat shock gene of Escherichia coli. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 745-746, p. 1–5, 2013.

GRUDNIAK, A. M.; WŁODKOWSKA, J.; WOLSKA, K. I. Chaperone DnaJ Influences the Formation of Biofilm by Escherichia coli. v. 64, n. 3, p. 279–283, 2015.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1034–1043, 2009.

HOKE, D. E. et al. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of Leptospira spp. and Pseudoalteromonas tunicata. **Infection and immunity**, v. 76, n. 5, p. 2063–9, 2008.

IRAOLA, G. et al. Transcriptome Sequencing Reveals Wide Expression Reprogramming of Basal and Unknown Genes in Leptospira biflexa. **American Society for Microbiology**, p. 1–16, 2016a.

JARRETT, C. O. et al. Transmission of Yersinia pestis from an infectious biofilm in the flea vector. **The Journal of infectious diseases**, v. 190, n. 4, p. 783–792, 2004.

KARUNAKARAN, E.; MUKHERJEE, J. “ Biofilmology ” : a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1869–1881, 2011.

KASSEGNE, K. et al. Identification of collagenase as a critical virulence factor for invasiveness and transmission of pathogenic leptospira species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 7, p. 1105–1115, 2014.

KHEMIRI, A.; JOUENNE, T.; COSETTE, P. Proteomics dedicated to biofilmology : What have we learned from a decade of research ? **Medical Microbiology and Immunology**, 2015.

KING, A. M. et al. High-temperature protein G is an essential virulence factor of Leptospira interrogans. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1123–1131, 2014.

KLEPP, L. I. Impact of the deletion of the six mce operons in Mycobacterium smegmatis. **Microbes Infect**, v. 14, n. 0, p. 590–599, 2013.

KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820–825, 1999.

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

KOMI, K. K. et al. ChpK and MazF of the toxin-antitoxin modules are involved in the virulence of *Leptospira interrogans* during infection. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 1, p. 34–47, 2015.

KUBONIWA, M. et al. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. **Expert Rev Proteomics**, v. 9, n. 3, p. 311–323, 2013.

KUMAR, K. V. et al. Molecular detection of pathogenic leptospiral protein encoding gene (lipL32) in environmental aquatic biofilms. **Lett Appl Microbiol**, 2015a.

KUMAR, K. V. et al. Co-existence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with *Azospirillum*. **FEMS Microbiology Ecology**, p. 1–27, 2015b.

KUMAR, K. V. et al. In Vitro Antimicrobial Susceptibility. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, 2016.

LAMBERT, A. et al. FlaA Proteins in *Leptospira interrogans* Are Essential for Motility and Virulence but Are Not Required for Formation of the Flagellum Sheath. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 2019–2025, 2012.

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

LEVETT, P. N. Systematics of Leptospiraceae. 2015.

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

LOURDAULT, K. et al. Inactivation of *clpB* in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 9, p. 3711–3717, 2011.

MACIEL, E. A P. et al. Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum communities. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 1, 2008.

MOE, K. K. et al. The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 72, n. 4, p. 411–416, 2010.

MURRAY, G. L. et al. *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. **Microbes and Infection**, n. December, p. 1–4, 2008.

MURRAY, G. L. et al. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 3, p. 952–

8, 2009.

MURRAY, G. L. The lipoprotein LipL32, An enigma of leptospiral biology. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2-4, p. 305–314, 2013.

NASCIMENTO, A. L. T. O. et al. Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis †. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164–2172, 2004.

ORME, R. et al. Proteomic analysis of *Escherichia coli* biofilms reveals the overexpression of the outer membrane protein OmpA. **Proteomics**, v. 6, n. 15, p. 4269–4277, 2006.

PAPPAS, C. J.; PICARDEAU, M. Control of gene expression in *Leptospira* spp. by transcription activator-like effectors demonstrates a potential role for LigA and LigB in *Leptospira interrogans* virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 22, p. 7888–7892, 2015.

PINNE, M.; HAAKE, D. A. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

RISTOW, P. et al. The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 7, p. e97, 2007.

RISTOW, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 1309–1317, 2008.

ROSINI, R.; MARGARIT, I. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae* : influence of environmental conditions and implicated virulence factors. **Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. February, p. 2013–2016, 2015.

SANTOS, A. et al. Leptospiral Biofilm formed by Anionic Saccharidic Moieties is a Frequent Phenotype in Kidney Colonization of Natural Reservoir Rats (manuscrito em preparo).

SAPI, E. et al. Characterization of Biofilm Formation by *Borrelia burgdorferi* In Vitro. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2012.

SAUER, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofil. **Society**, v. 184, n. 4, p. 1140–1154, 2002.

SAUER, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. **Genome Biology**, 2003.

SINGH, R. et al. Microbial Diversity of Biofilms in Dental Unit Water Systems Microbial Diversity of Biofilms in Dental Unit Water Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3412–3420, 2003.

WANG, X.; WOOD, T. K. Toxin-Antitoxin Systems Influence Biofilm and Persister Cell Formation and the General Stress Response □. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 16, p. 5577–5583, 2011.

YI, L. et al. Identification and characterization of a *Streptococcus equi* ssp . zooepidemicus immunogenic GroEL protein involved in biofilm formation. **Veterinary Research**, p. 1–9, 2016.

ZHANG, K. et al. Leptospiral LruA is required for virulence and modulates an interaction with mammalian apolipoprotein AI. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3872–3879, 2013.

ZHANG, L. et al. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. v. 83, n. February, p. 1006–1023, 2012.

ZHANG, Y. et al. OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar Lai is cytotoxic to cultured rat renal cells and promotes inflammatory responses. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 42, n. 1, p. 70–79, 2010.