PRISCILA NOGUEIRA DE OLIVEIRA

**Avaliação do papel de proteases secretadas por *Leptospira* na
degradação e inativação do peptídeo antimicrobiano LL-37**

São Paulo

2020

PRISCILA NOGUEIRA DE OLIVEIRA

Avaliação do papel de proteases secretadas por *Leptospira* na degradação e inativação do peptídeo antimicrobiano LL-37

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências.

Departamento

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Angela Silva Barbosa

De acordo:

Orientador

São Paulo
2020

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3938 FMVZ	<p>Oliveira, Priscila Nogueira de Avaliação do papel de proteases secretadas por <i>Leptospira</i> na degradação e inativação do peptídeo antimicrobiano LL-37 / Priscila Nogueira de Oliveira. – 2020. 67 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2020.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses. Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses. Orientadora: Profa. Dra. Angela Silva Barbosa.</p> <p>1. <i>Leptospira</i>. 2. Proteases secretadas. 3. Peptídeo antimicrobiano LL-37 (Catelicidina). I. Título.</p>
-----------------	---

São Paulo, 27 de fevereiro de 2019
CEUAX N 7904060318

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Angela Silva Barbosa

Área: Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses

Equipe envolvida: Priscila Nogueira De Oliveira - [executor](#) (instituto Butantan); Angela Silva Barbosa (orientador)

Título do projeto: "AVALIAÇÃO DO PAPEL DE PROTEASES SECRETADAS POR LEPTOSPIRA NA DEGRADAÇÃO E INATIVAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO LL-37".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 15/08/2018, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

CERTIFIED

We certify that the Research "Role of Leptospira secreted proteases in the degradation and inactivation of the antimicrobial peptide LL-37", protocol number CEUAX 7904060318 (ID 000984), under the responsibility Angela Silva Barbosa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day August 15, 2018.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DO PAPEL DE PROTEASES SECRETADAS POR LEPTOSPIRA NA DEGRADAÇÃO E INATIVAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO LL-37", protocolado sob o CEUAX nº 7904060318, sob a responsabilidade de Angela Silva Barbosa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 15 de agosto de 2018.

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Autor: OLIVEIRA, Priscila Nogueira de

Título: Avaliação do papel de proteases secretadas por *Leptospira* na degradação e inativação do peptídeo antimicrobiano LL-37

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Pai pela conclusão de mais uma etapa de minha vida.

A minha orientadora Dr^a Angela S. Barbosa por todos os ensinamentos, paciência, carinho e respeito dirigidos não só a mim, mas a todos os seus alunos e companheiros de trabalho.

A Dr^a Patrícia A.E.A. de Anis, pelos ensinamentos e carinho. A Dr^a Márcia Franzolin pela constante alegria e simplicidade. E a todos os demais pesquisadores da Bacteriologia do Instituto Butantan.

A todas as flores que alegram e perfumam o Laboratório de Bacteriologia todos os dias ao longo de cada estação: Aline Gonçalves, Daniella Courrol, Denize Monaris, Gabriela Pacheco, Joana Ho, Julia Tardis, Kamila Nunes, Letícia Guerra e Matilde Souza.

Aos demais alunos e funcionários do setor pela amizade, carinho e respeito. Em especial: Camila Bueno, Susana Barreto e Suzi Alcantra.

A minha família, por todo amor e aos meus amigos de mais longa data pelo suporte emocional e apoio. Em especial: Cleriston Andrade, por ser sempre um irmão.

Ao meu querido professor e amigo Allison Higino, pela motivação e carinho ao longo dos anos.

Ao Dr. Marcos Bryan e aos integrantes do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (FMVZ/USP) pelo fornecimento das culturas de *Leptospira*.

A Dr^a Simone Balian e a Sandrinha, pessoas que tive imenso prazer de conviver e aprender ao longo de um período como aluna PAE.

Aos funcionários Danival Lopes e Vanessa Bispo pelo excelentíssimo trabalho que prestam ao VPS, por toda educação, respeito e carinho.

Ao Instituto Butantan (IB) e a Universidade de São Paulo (USP), pela oportunidade de realizar este projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo: 131434/2018-7 pelo financiamento desta pesquisa. E a

Processo nº 2018/12896-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto temático.

E por fim, a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho.

“O conhecimento dos fatores determinantes das doenças permite a aplicação de medidas preventivas com o propósito de resolver o problema.”

(Epidemiologia: Teórica e Prática – Pereira, M.G. 1995)

RESUMO

OLIVEIRA, P.N. **Avaliação do papel de proteases secretadas por *Leptospira* na degradação e inativação do peptídeo antimicrobiano LL-37.** 2020. 67 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Leptospiras são bactérias espiroquetas com grande capacidade invasiva, dotadas de estratégias eficientes para disseminação no hospedeiro. Recentemente, nosso grupo demonstrou que leptospiras patogênicas secretam proteases capazes de clivar e inativar moléculas-chave do sistema complemento humano. Neste projeto pretende-se ampliar o leque de investigação de possíveis alvos das proteases secretadas por leptospiras patogênicas. O novo alvo a ser estudado é a catelicidina humana (LL-37), um peptídeo antimicrobiano que possui 37 aminoácidos, cuja proteína precursora é denominada hCAP18, devido à sua massa molecular de 18 kDa. Peptídeos antimicrobianos são moléculas pequenas, solúveis, que desempenham um papel importante na resposta imune inata. Porém, alguns patógenos de importância médica conseguem sobreviver à ação dessas moléculas através de mecanismos de resistência. Dentro deste contexto, este estudo tem como objetivo avaliar a atividade de proteases secretadas por estirpes patogênicas, virulentas ou atenuadas em cultura, bem como por estirpes saprófitas da bactéria *Leptospira* quanto à capacidade de degradar o peptídeo antimicrobiano LL-37. Os resultados apontam a existência de proteases presentes nos sobrenadantes das estirpes patogênicas capazes de degradar o LL-37 de forma tempo-dependente, fato não observado com os sobrenadantes das estirpes saprófitas. Ensaio subsequentes realizados com inibidores de proteases demonstraram que a atividade proteolítica dos sobrenadantes é impossibilitada com o uso do inibidor 1,10-fenantrolina, sugerindo assim que tais proteases pertençam à classe das metaloproteases. De posse desta informação, avaliamos a atividade de duas metaloproteases recombinantes candidatas, a termolisina (codificada pela LIC13322) e a papalisina, secretadas por estirpes patogênicas de *Leptospira*. Entretanto, o peptídeo foi resistente à ação proteolítica de ambas, e o envolvimento destas metaloproteases neste processo foi descartado. Além disto, a atividade antibacteriana do LL-37 foi avaliada frente a duas estirpes de *Leptospira*. Os achados apontaram uma maior resistência da estirpe patogênica à ação peptídeo quando comparado à estirpe saprófita. Nossos dados sugerem que a secreção de proteases por estirpes patogênicas pode integrar o arsenal de virulência dessas espiroquetas, tendo em vista que tais proteases foram capazes de inativar a catelicidina humana nos ensaios realizados. Acredita-se que a caracterização de mecanismos relacionados à patogênese da bactéria *Leptospira* possam, eventualmente, contribuir para o futuro desenvolvimento de estratégias terapêuticas e/ou preventivas que interferiram no processo de invasão e destruição tecidual observados na leptospirose.

Palavras-chave: *Leptospira*. Proteases secretadas. Peptídeo antimicrobiano LL-37 (Catelicidina)

ABSTRACT

OLIVEIRA, P.N. **Evaluation of the role of proteases secreted by *Leptospira* in the degradation and inactivation of the antimicrobial peptide LL-37.** 2020. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Leptospira are highly invasive spirochetes equipped with efficient strategies for dissemination in the host. Recently, our group demonstrated that pathogenic *leptospira* secrete proteases capable of cleaving and inactivating key molecules of the human complement system. This project aims to broaden the scope of investigation of possible targets of proteases secreted by pathogenic *leptospira*. The new target to be studied is human cathelicidin (LL-37), an antimicrobial peptide that has 37 amino acids, whose precursor protein is called hCAP18, because of its molecular mass of 18 kDa. Antimicrobial peptides are small, soluble molecules that play an important role in the innate immune response. However, some pathogens of medical importance can survive the action of these molecules through mechanisms of resistance. In this context, this study aims to evaluate the activity of proteases secreted by pathogenic, and saprophytic *Leptospira* strains with regard to their ability to degrade the antimicrobial peptide LL-37. The results obtained so far point to the existence of proteases present in the supernatants of pathogenic strains capable of degrading LL-37 in a time-dependent manner, a fact not observed with the supernatants of the saprophytic strains. Subsequent assays performed with protease inhibitors demonstrated that the proteolytic activity of the supernatants is prevented by the use of the 1,10-phenanthroline inhibitor, thus suggesting that such proteases belong to the class of metalloproteases. Based on this information, we evaluated the activity of two candidate recombinant metalloproteases, thermolysin (encoded by LIC13322) and pappalysin, both secreted by pathogenic *Leptospira* strains. However, the peptide proved to be resistant to the proteolytic action of both, thus ruling out the involvement of these metalloproteases in this process. In addition, the antibacterial activity of LL-37 was evaluated against two *Leptospira* strains. Our findings showed a greater resistance of the pathogenic strain to the peptide action when compared to the saprophytic strain. Our data suggest that the secretion of proteases by pathogenic strains can integrate the virulence arsenal of these spirochetes, considering that such proteases were able to inactivate human cathelicidin in the assays performed. It is believed that the characterization of mechanisms related to the pathogenesis of *Leptospira* may eventually contribute to the future development of therapeutic and / or preventive strategies that may interfere in the process of invasion and tissue destruction observed in leptospirosis.

Keywords: *Leptospira*. Secreted proteases. Antimicrobial peptide LL-37 (Cathelicidin)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação das espécies de <i>Leptospira</i>	14
Figura 2 - Representação esquemática da termolisina de <i>Leptospira</i> codificada pela LIC13322 e alinhamento do domínio catalítico das quatro termolisinas presentes em leptospiros patogênicas.....	19
Figura 3 - Representação esquemática do modelo de formação de barril	22
Figura 4 - Representação esquemática do modelo de formação de carpete	23
Figura 5 - Representação esquemática do modelo SMH	24
Figura 6 - Representação esquemática do processamento característico de uma proteína da família catelicidina	26
Figura 7 - Representação esquemática do peptídeo antimicrobiano LL-37.....	27
Figura 8 - Mecanismos de resistência a peptídeos antimicrobianos apresentados por bactérias.....	29
Figura 9 - Perfil eletroforético dos sobrenadantes de estirpes de leptospiros	41
Figura 10 - Avaliação da atividade proteolítica dos secretados de leptospiros sobre a catelicidina humana.....	43
Figura 11 - Identificação da classe de proteases envolvidas na degradação do peptídeo antimicrobiano LL-37.....	47
Figura 12 - Atividade proteolítica de proteases presentes no secretado de <i>Leptospira</i> sobre outros peptídeos antimicrobianos.....	49
Figura 13 - Avaliação da atividade proteolítica das proteases termolisina e papalisina recombinantes sobre a catelicidina humana.....	51
Figura 14 - Avaliação da atividade antibacteriana da catelicidina humana sobre as estirpes LPF (patogênica, virulenta) e Patoc (saprófita) de <i>Leptospira</i>	53

LISTA DE GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Sorovares de <i>Leptospira</i> utilizadas no trabalho.....	34
Quadro 2 - Classes de inibidores de proteases utilizadas no ensaio.....	38
Gráfico 1 - Degradação proteolítica do peptídeo LL-37 por secretado de estirpes de leptospiros ao longo do tempo	45
Gráfico 2 - Avaliação da atividade antibacteriana da catelicidina humana sobre as estirpes LPF (patogênica) e Patoc (saprófita) de <i>Leptospira</i>	54
Tabela 1 - Média e o desvio padrão (SD) dos ensaios (realizados em triplicata) apresentados no Gráfico 1	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. O GÊNERO <i>LEPTOSPIRA</i>	13
1.2. LEPTOSPIROSE.....	15
1.2.1. Aspectos clínicos e transmissão da doença	15
1.2.2. Aspectos epidemiológicos e diagnóstico da doença	16
1.2.3. Proteases secretadas por leptospiiras patogênicas	17
1.3. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	20
1.3.1. Defensinas	24
1.3.2. Catelicidinas	25
1.3.2.1. Catelicidina humana (LL-37)	27
1.4. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS POR PATÓGENOS.....	29
1.5. O LL-37 COMO ALVO DE PROTEASES SECRETADAS POR <i>LEPTOSPIRA</i> ..	31
2. OBJETIVO	32
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. SOLUÇÕES E REAGENTES.....	33
3.2. SOROVARES DE <i>LEPTOSPIRA</i> E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	34
3.3. OBTENÇÃO DE SOBRENADANTES DAS CULTURAS DE <i>LEPTOSPIRA</i>	35
3.4. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO: TERMOLISINA E PAPALISINA RECOMBINANTES.....	35
3.5. TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	36
3.5.1. Eletroforese em gel de sds-page	36
3.6. COLORAÇÃO POR PRATA.....	36
3.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROTEASES PRESENTES NOS SECRETADOS DE LEPTOSPIRAS SOBRE O PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO LL-37	37

3.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROTEASES PRESENTES NO SECRETADO DE <i>LEPTOSPIRA</i> SOBRE OUTROS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.....	37
3.9. IDENTIFICAÇÃO DA CLASSE DE PROTEASES ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DO PEPTÍDEO LL-37 PELO USO DE INIBIDORES ESPECÍFICOS.....	38
3.10. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	39
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1. PROTEASES SECRETADAS POR LEPTOSPIRAS: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.....	41
4.2. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROTEASES PRESENTES NOS SECRETADOS DE LEPTOSPIRAS SOBRE A CATELICIDINA HUMANA.....	42
4.3. IDENTIFICAÇÃO DA NATUREZA DAS PROTEASES ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DO PEPTÍDEO LL-37 PELO USO DE INIBIDORES ESPECÍFICOS.....	46
4.4. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROTEASES PRESENTES NO SECRETADO DE <i>LEPTOSPIRA</i> SOBRE OUTROS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.....	48
4.5. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DAS METALOPROTEASES TERMOLISINA E PAPALISINA SOBRE A CATELICIDINA HUMANA.....	50
4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA CATELICIDINA HUMANA.....	52
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Leptospira*

Leptospiras são bactérias espiroquetas aeróbias, Gram-negativas. Possuem forma fina, alongada e helicoidal, e se locomovem rapidamente em meios viscosos, o que facilita a invasão e colonização do hospedeiro (PICARDEAU, 2017). Apresentam extremidades em forma de gancho e flagelos localizados no espaço periplasmático, que conferem movimentos de rotação e translação (LEVETT, 2001). São bactérias que se propagam lentamente, com temperatura ótima de crescimento na faixa de 30° C, capazes de sobreviver em solo úmido e água por extensos períodos (HENRY; JOHNSON, 1978). Além disso, formam biofilme como mecanismo para auxiliar sua sobrevivência (RISTOW et al., 2008). Até o momento foram descritas 64 espécies de *Leptospira* classificadas em dois clados, sendo cada clado subdividido em dois subclados. O clado P está constituído por espécies patogênicas e o clado S por espécies saprófitas (VINCENT et al., 2019) conforme demonstrado na Figura 1.

Figura 1 - Classificação das espécies de *Leptospira*

Até o momento foram descritas 64 espécies de *Leptospira*, agrupadas em três clados distintos (patogênicas, intermediárias e saprófitas). Fonte: Vincent et al., 2019.

1.2. LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma doença transmitida entre animais e de animais para o homem, causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (BRASIL,1995). De modo geral, o homem é acometido pela enfermidade em atividades ocupacionais e recreativas através do contato direto com urina, sangue e tecidos de animais portadores. A infecção pode se dar ainda de forma indireta, por contato com água ou solo contaminados, devido às condições precárias de saneamento básico, como no caso de países em desenvolvimento. Membranas mucosas ou lesões na pele servem como porta de entrada para a bactéria (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Porém, em condições que favoreçam a dilatação dos poros, como a permanência por tempo prolongado em água contaminada, é possível que ocorra a infecção pela pele íntegra (BRASIL, 1995).

1.2.1. Aspectos clínicos e transmissão da doença

Durante a infecção, leptospiras patogênicas atingem diversos órgãos e tecidos e causam danos no endotélio de pequenos vasos sanguíneos (LEVETT, 2001). As manifestações clínicas da doença são variadas, uma vez que a bactéria pode se disseminar pela corrente sanguínea e atingir diversos órgãos. Casos graves caracterizam-se por febre, insuficiência hepática e renal, complicações pulmonares e também falha reprodutiva no caso dos animais (ELLIS et al., 1986; BERNARD, 1993; GROOMS, 2006; LÉON et al., 2006).

Os animais são hospedeiros primários da bactéria e o ser humano, por sua vez, participa do ciclo como hospedeiro acidental, sendo pouco eficiente na manutenção dos focos de infecção (BRASIL,1995). O início dos sintomas no homem pode variar de um dia a um mês após o contato com a bactéria e os sinais clínicos ocorrem de forma variada devido a fatores como a estirpe infectante e o estado de saúde do indivíduo acometido (PLANK; DEAN, 2000). Os animais suscetíveis são infectados quando entram em contato com urina ou tecidos de animais portadores. Camundongos e ratos, entretanto, são hospedeiros reservatórios, ou seja, albergam a bactéria não apresentando sinais clínicos, sendo assim, importantes agentes para manutenção do ciclo de vida da bactéria (BHARTI et al., 2003). Suínos e bovinos

apresentam sinais clínicos como queda na produção, falha reprodutiva, natimortos, abortamento e nascimento de crias debilitadas. Já em equinos, embora não seja um quadro exclusivo desta espécie, comumente se observa a ocorrência de uveíte (ROHRBACH et al., 2005). Em cães, são descritas manifestações como icterícia, febre, vômito, uremia, diarreia, hemorragia, insuficiência renal e complicações reprodutivas (BOLIN et al., 1989). Segundo Levett (2001), animais que se reestabelecem da doença, podem vir a tornarem-se portadores assintomáticos. As espécies saprófitas do gênero *Leptospira* estão presentes no ambiente como organismos de vida livre, não colonizam hospedeiros e, em experimentos utilizando animais, não são capazes de provocar infecção (CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009).

1.2.2. Aspectos epidemiológicos e diagnóstico da doença

A leptospirose é uma zoonose de impacto mundial. Anualmente, são relatados mais de 1 milhão de casos da doença, com aproximadamente 60 mil óbitos (COSTA et al., 2015). Segundo os dados do Ministério da Saúde, em 2019 foram registrados no Brasil 3.368 casos confirmados de leptospirose e 280 mortes (BRASIL, 2020). Leptospiras conseguem sobreviver por mais tempo em ambientes quentes e úmidos. Desta forma, a doença possui maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais úmidas (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). A incidência da leptospirose está relacionada principalmente a localidades com saneamento básico precário e regiões sujeitas a enchentes (FRAGA et al., 2015). Além disto, dada a diversidade de hospedeiros que podem albergar a bactéria e excretá-la no ambiente, a leptospirose é uma doença que também está associada à atividade ocupacional, podendo afetar agricultores, veterinários e trabalhadores de matadouros, por exemplo (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

O diagnóstico da leptospirose pode ser dificultado, já que outras doenças tropicais compartilham sintomas clínicos com esta infecção. Desta forma, é importante para o médico estar informado sobre todo o histórico do paciente, incluindo informações sobre viagens e sua ocupação profissional. Para fins de diagnóstico, durante a fase aguda da doença o clínico pode solicitar amostras de sangue, urina ou líquido cefalorraquidiano para que seja realizada a cultura da bactéria. Entretanto, tendo em vista a taxa de crescimento lenta da *Leptospira*, esta

metodologia não fornece um diagnóstico imediato. Outro método que pode ser utilizado nesta fase é a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), considerado rápido e sensível. À medida que as leptospiros vão se disseminando para os órgãos, o sorodiagnóstico é a metodologia mais adequada para detecção da bactéria. Podem ser realizados testes de ELISA IgM / IgG e, para confirmação, o método padrão ouro recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é o teste de aglutinação microscópica (MAT). Neste teste, um painel de estirpes referência são utilizadas como antígenos e o resultado fornece o provável sorogrupo infectante. No entanto, este teste é restrito a laboratórios de referência (FRAGA et al., 2015) .

1.2.3. Proteases secretadas por leptospiros patogênicas

A grande capacidade de disseminação de leptospiros patogênicas é atribuída não apenas à eficiência que possuem para se locomover na circulação, mas também ao fato de possuírem estratégias para modular o microambiente que as cerca, incluindo mecanismos para subverter a resposta imune inata do hospedeiro (MERI et al., 2005; BARBOSA et al., 2009). A secreção de proteases com o potencial de inativar proteínas essenciais do hospedeiro é uma importante ferramenta usada por diversos microrganismos durante o processo de colonização. Patógenos se utilizam deste mecanismo como uma importante classe de fatores de virulência, desempenhando funções relacionadas à invasão, evasão imune, nutrição e reprodução (ARMSTRONG, 2006).

Trabalhos recentes mostram que leptospiros patogênicas utilizam-se dessa estratégia, secretando proteases capazes de degradar proteínas do sistema complemento humano, conseguindo, dessa forma, sobreviver à atividade bactericida deste sistema na circulação e, conseqüentemente, atingir órgãos-alvo (FRAGA et al., 2014; AMAMURA et al., 2017).

Essas proteases também alvejam proteínas da matriz extracelular, auxiliando potencialmente o processo de invasão (SILVA et al., 2018). Além disso, leptospiros são também capazes de recrutar proteases do hospedeiro, como plasminogênio, e ativá-lo em sua superfície (VIEIRA et al., 2010). A plasmina gerada pode degradar componentes da matriz extracelular e outros substratos fisiológicos como fibrinogênio e o componente C3b do sistema complemento humano

(CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2016). É possível que este seja mais um mecanismo que contribua para os processos de invasão e evasão imune desta bactéria.

As proteases são enzimas pertencentes ao grupo de hidrolases, cuja função está relacionada à quebra de ligações peptídicas de proteínas e estão relacionadas a processos biológicos essenciais. A classificação das proteases é baseada em três critérios primários: a) natureza química do sítio catalítico, b) tipo de reação catalisada, e c) sua estrutura. As proteases podem ser subdivididas em dois grupos principais, as endopeptidases e as exopeptidases, de acordo com o local de clivagem proteolítica no substrato. As endopeptidases são ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo presente em seu sítio de catálise, podendo ser classificadas como: proteases de serina, proteases de treonina, proteases de cisteína, proteases de ácido aspártico, proteases de ácido glutâmico e metaloproteases (TREMACOLDI, 2009).

Metaloproteases da classe das termolisinas de *Enterococcus faecalis* e *Clostridium perfringens* são capazes de hidrolisar diversos substratos, incluindo colágenos, fibrinogênio, insulina e moléculas do sistema complemento (JIN et al., 1996; PARK et al., 2008). A análise dos genomas de leptospiros disponíveis permitiu a identificação de uma classe de quatro termolisinas nos sorovares patogênicos de *Leptospira*, codificadas pelos genes LIC13320, LIC13321, LIC13322 e LIC10715. O domínio catalítico dessas proteases (Figura 2) possui alto grau de similaridade com aquele presente em metaloproteases de outras bactérias conhecidas por hidrolisar uma gama de substratos dentre os quais proteínas do complemento, peptídeos antimicrobianos e moléculas da matriz extracelular. Análises computacionais e ensaios de *Western Blot* com sobrenadante de cultura de diversos sorovares patogênicos realizados por nosso grupo indicam que tais proteases são secretadas para o meio extracelular (FRAGA et al., 2014). Dados mais recentes mostraram que a termolisina codificada pela LIC13322 degrada as proteínas C3 e C6 do sistema complemento humano (FRAGA et al., 2014; AMAMURA et al., 2017) e os proteoglicanos decorina e biglicano (dados não publicados).

Em outro estudo realizado por nosso grupo em que foi feita uma análise do exoproteoma da estirpe virulenta LPF (*L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm) foram identificadas algumas proteases, dentre as quais a metaloprotease

Sabendo-se da variedade de moléculas do sistema imunológico que são alvos de proteases secretadas por patógenos favorecendo sua evasão e colonização. Avaliamos neste trabalho, se os peptídeos antimicrobianos também poderiam ser um desses alvos para as leptospiros.

1.3. Peptídeos Antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas de baixa massa molecular (12 a 50 resíduos de aminoácidos), solúveis, que desempenham um papel importante na resposta imune inata ao inibir o crescimento de microrganismos na pele e em superfícies mucosas e sua subsequente disseminação. São antibióticos naturais produzidos por diversos tipos celulares [células epiteliais, leucócitos (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e mastócitos), plaquetas, células endoteliais e adipócitos] em resposta a um dano tecidual ou a um estímulo infeccioso. Estão presentes nos fluidos corporais e em secreções como saliva, urina e suor (COLE & NIZET, 2016). Facilitam a eliminação de microrganismos devido sua composição de aminoácidos, carga catiônica que é conferida pela presença abundante de resíduos de aminoácidos básicos como a arginina e a lisina, por exemplo, tamanho e anfipaticidade, que facilitam o processo de inserção na membrana de seus alvos e assim induzem danos deletérios nos mesmos (BROGDEN, 2005).

Os PAMs são produzidos por organismos eucariotos e procariotos (BROEKAERT et al., 1997). Apesar da variedade estrutural dos peptídeos antimicrobianos, é possível agregá-los em dois grupos baseando-se em sua estrutura secundária: peptídeos com estrutura em α -hélice e os peptídeos com folha- β (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006). Alguns dos arranjos em folha- β exibem abundância em determinados resíduos de aminoácidos, como o caso das defensinas, que são ricas em resíduos de cisteína (BRAFF; GALLO, 2006). Já a estrutura primária desses peptídeos pode sofrer variação, embora o caráter anfipático seja mantido (DENNISON et al., 2005). No homem, são encontrados peptídeos antimicrobianos como a catelicidina e as defensinas (KAISER; DIAMOND, 2000).

Há vários modelos que demonstram que o mecanismo de ação dos PAMs ocorre por combinação de efeitos eletroestáticos e hidrofóbicos (SANDERSON, 2005). Porém, o modo como ocorre a permeabilização dos peptídeos na membrana do patógeno e execução de sua função microbicida não são completamente elucidados, mas existem diversos mecanismos propostos, dentre eles os modelos: a) formação de barril, b) formação de carpete, e c) modelo Shai, Matsuzaki e Huang (SMH) (SHAI, 2002; BECHINGER; LOHNER, 2006).

Os modelos de barril e carpete são utilizados para explicar como ocorre a lise de patógenos por peptídeos de estrutura em α -hélice. No modelo de formação de barril (Figura 3), os peptídeos helicoidais se ligam à superfície do patógeno posicionando sua face catiônica orientada para os grupamentos fosfato da membrana lipídica do microrganismo. Este processo se mantém até que os peptídeos atinjam determinada concentração na superfície que possibilite os monômeros do peptídeo se agruparem e se inserirem na membrana, levando à formação de um poro (SANDERSON, 2005). Nesta etapa, a passagem de íons e pequenas moléculas através do poro é facilitado devido as regiões hidrofóbicas do peptídeo estarem ligadas à região apolar da membrana do patógeno (SHAI, 2002).

Figura 3 - Representação esquemática do modelo de formação de barril

Em vermelho: regiões hidrofílicas do peptídeo, e em azul: regiões hidrofóbicas. Fonte: Brogden, 2005.

No modelo carpete (Figura 4), o peptídeo adere paralelamente à superfície da membrana do patógeno formando um aglomerado de moléculas, que lembra um “carpete”. A ligação ocorre através da região hidrofílica do peptídeo aos grupos fosfato presentes na membrana do microrganismo. Posteriormente, o peptídeo se rearranja orientando seus resíduos hidrofóbicos para o interior da região hidrofóbica da membrana, o que gera a redistribuição dos lipídeos, ocasionando uma tensão na curvatura da membrana (REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004).

Figura 4 - Representação esquemática do modelo de formação de carpete

Em vermelho: regiões hidrofílicas do peptídeo, e em azul: regiões hidrofóbicas. Fonte: Brogden, 2005.

Por fim, o modelo SMH propõe que ocorra uma associação entre as interações superficiais e formação dos poros. Sendo assim, o processo inicial ocorre como no modelo de “carpete”, gerando uma desordem estrutural na membrana do patógeno, ou ainda gerando o rompimento da membrana permitindo a passagem dos peptídeos para o interior do alvo (Figura 5) (HUANG, 2006).

Figura 5 - Representação esquemática do modelo SMH

a) Representação das interações ocorridas entre o peptídeo e a membrana do patógeno. **b)** adsorção do peptídeo à membrana gerando desordem em sua estrutura. **c)** Formação do poro. **d)** O peptídeo entra na membrana interna e se liga. **e)** Representação de peptídeos que interagem com alvos internos do patógeno. **f)** Degradação da membrana. Fonte: Zasloff, 2002.

1.3.1. Defensinas

As defensinas são peptídeos catiônicos, ricos em arginina e possuem massa molecular de 3 a 4 kDa. São caracterizados pela presença de seis resíduos de cisteínas ligados por pontes dissulfeto. A estrutura desses peptídeos pode variar de 20 a 45 aminoácidos e em sua família são encontradas duas defensinas principais, as α e β (GANZ et al., 1985).

- a) **α -defensinas:** Foram isoladas em 1985 e são constituídas por uma cadeia com cerca de 29 a 35 resíduos de aminoácidos. Os peptídeos HNP (peptídeos de neutrófilos humanos) 1 – 4 são encontrados nos grânulos azurófilos dos neutrófilos

(SELSTED et al., 1985). Já as α -defensinas 5 e 6, são encontradas principalmente nas células de Paneth no intestino delgado e nas células epiteliais do trato urogenital feminino (QUAYLE et al., 1998; TANG et al., 1999).

- b) **β -defensinas:** Constituídas de 36 a 42 resíduos de aminoácidos, estes peptídeos estão presentes em mamíferos, aves e reptéis (ZASLOFF, 2019). A β -defensina 1 é expressa no trato respiratório e geniturinário; é produzida de forma constitutiva e não altera seu padrão de produção por estímulos infecciosos (SINGH et al., 1998). Por sua vez, a β -defensina 2 pode ser encontrada no tecido epitelial da pele e nos tratos respiratório e intestinal, por exemplo. Entretanto, para ter sua expressão induzida, é necessário haver estímulo infeccioso (HIRATSUKA et al., 1998).

1.3.2. Catelicidinas

As catelicidinas são uma família de peptídeos antimicrobianos encontrados em vertebrados, armazenados como proformas inativas nos grânulos de neutrófilos (AMER; BISHOP; VAN HOEK, 2010), células *Natural Killer* (NK) (BÜCHAU et al., 2010) e mastócitos (DI NARDO; VITIELLO; GALLO, 2003). Tais proteínas são caracterizadas por possuir sua região precursora altamente conservada, formada por um peptídeo sinal seguido de um domínio similar ao da proteína catelina, e sua região C-terminal é a porção variável (Figura 6) (GENNARO; ZANETTI, 2000). O processamento pode ocorrer por diversas proteases de serina, conforme o tipo ou tecido celular (VANDAMME et al., 2012).

Figura 6 - Representação esquemática do processamento característico de uma proteína da família catelicidina

A pré-proteína é constituída de uma região conservada e outra variável. Há um peptídeo sinal ao lado da região conservada (domínio catelina) orientando a proproteína para o local onde ocorrerá sua secreção (grânulos ou membrana celular). A região variável codifica o peptídeo antimicrobiano de catelicidina. O processamento pode ocorrer por diversas proteases de serina de acordo com o tipo ou tecido celular. Fonte: Vandamme et al., 2012.

Os genes desta família são compostos por quatro exons e três íntrons. A região conservada é codificada pelos três primeiros exons que são semelhantes entre si, e o quarto exon codifica a região terminal da proteína que configura o domínio antimicrobiano ativo (LI et al., 2000).

Ao sofrer processamento por enzimas proteolíticas as catelicidinas dão origem aos peptídeos antimicrobianos ativos, que ao serem liberados do precursor são atraídos por interações eletroestáticas para a superfície celular de patógenos devido sua carga catiônica (BROT; WEISSBACH, 2000). É importante ressaltar que a expressão da catelicidina em humanos e primatas é regulada pela vitamina D. Em contrapartida, em animais com hábito de vida noturno, a expressão é induzida por óxido nítrico (NO) (LIU et al., 2006).

Estudos demonstram que além da atividade microbicida, algumas catelicidinas estão envolvidas em processos biológicos, tais como quimiotaxia de neutrófilos, estimulação do sistema imune adaptativo e neutralização de endotoxina por ligação à célula bacteriana (YANG; CHERTOV; OPPENHEIM, 2001).

1.3.2.1. Catelicidina humana (LL-37)

A catelicidina humana (LL-37) é um peptídeo antimicrobiano de massa molecular de 4 kDa e 37 aminoácidos (Figura 7). Sua proteína precursora é denominada hCAP18, que é armazenada nos grânulos de neutrófilos e é secretada por diversos tipos celulares, tais como os neutrófilos, mastócitos, neutrófilos, células epiteliais e células NK. Sua expressão é constitutiva e regulada por estímulos inflamatórios (GALLO et al., 2002).

Figura 7 - Representação esquemática do peptídeo antimicrobiano LL-37

a) Estrutura tridimensional da catelicidina humana (LL-37): conformação em hélice-curvatura-hélice e região C-terminal. Na superfície côncava do peptídeo é possível verificar a presença de quatro cadeias laterais de fenilalanina que conferem hidrofobicidade ao peptídeo. **b)** Sequência de resíduos de aminoácidos do LL-37. As fenilalaninas estão representadas pela letra F e estão sublinhadas. Fonte: Vandamme et al., 2012.

A expressão das catelicidinas está relacionada à distribuição local de vitamina D ativa (1,25-Vitamina D) por indução direta da transcrição gênica na região promotora do gene CAMP no DNA humano (SCHAUBER et al., 2006). A catelicidina humana é descrita como um importante agente bactericida, mas este peptídeo também é responsável por desempenhar outras funções, como modulação da expressão de citocinas e quimiocinas de macrófagos e células dendríticas, além de seu envolvimento na quimiotaxia de células de defesa durante a resposta imunológica (KANDA et al., 2010).

A proteína hCAP-18 (precursora do peptídeo LL-37) é a única catelicidina encontrada em humanos, diferente de outras espécies de mamíferos, como bovinos

e suínos que contêm em seus neutrófilos uma variedade de catelicidinas (COWLAND; JOHNSEN; BORREGAARD, 1995; LARRICK et al., 1996). A catelicidina humana é encontrada em baixas concentrações no organismo. Além dos neutrófilos (SØRENSEN et al., 1997a), este peptídeo também é encontrado em epitélios escamosos (NILSSON et al., 1999), queratinócitos durante o processo inflamatório em doenças de pele (FROHM et al., 1997), pulmões (BALS et al., 1998) e sêmen (MALM et al., 2000).

Sua ação é de amplo espectro agindo contra bactérias Gram-positivas e negativas (TURNER et al., 1998), e atua de forma sinérgica com as defensinas (NAGAOKA et al., 2000). Porém, em níveis elevados o LL-37 pode ter efeito citotóxico nas células eucarióticas (JOHANSSON et al., 1998). Níveis de LL-37 acima do normal são atingidos em caso de doenças de pele, como a rosácea, por exemplo (YAMASAKI et al., 2007). No geral, em locais onde está ocorrendo inflamação é possível encontrar altos níveis da catelicidina, já que esta atua como um mecanismo de defesa do sistema imune inato contra patógenos (OVERHAGE et al., 2008). A eficácia da catelicidina contra bactérias (TURNER et al., 1998) e vírus (HOWELL et al., 2004) é similar à das defensinas (VANDAMME et al., 2012).

O mecanismo de ação do LL-37 ocorre conforme o modelo SMH descrito anteriormente, ou seja, inicialmente ocorre a formação do “carpete” através da associação do peptídeo (carga positiva) à membrana externa (fosfolípidos) do patógeno. À medida que ocorre acúmulo de peptídeo na membrana, esta entra em desordem devido ao rearranjo dos fosfolípidos em sua estrutura criando uma tensão de curvatura (LEE et al., 2011). Durante o processo, poros toroidais vão sendo formados, permitindo o acesso do peptídeo ao interior da célula, onde se ligará aos seus alvos (ZASLOFF, 2002). Além disto, outras moléculas do sistema imune com função antimicrobiana, como as defensinas, enzimas e espécies reativas de oxigênio (ERO) atuam juntamente com o peptídeo para desestabilizar a parede celular microbiana, proporcionando assim, uma resposta mais efetiva (VANDAMME et al., 2012).

1.4. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS POR PATÓGENOS

Alguns patógenos de importância médica possuem mecanismos de resistência a peptídeos antimicrobianos, o que os auxilia a causar infecções graves. Dentre os mecanismos conhecidos, vale ressaltar: alterações na carga da superfície bacteriana e na fluidez da membrana, efluxo ativo, inativação por digestão proteolítica e aprisionamento dos peptídeos por proteínas de superfície e polissacarídeos (Figura 8) (COLE & NIZET, 2016).

Figura 8 - Mecanismos de resistência a peptídeos antimicrobianos apresentados por bactérias

Fonte: Cole & Nizet, 2016.

- a) Modificação de membrana:** Esta estratégia é utilizada por bactérias Gram-positivas e negativas, e consiste na modificação dos componentes da parede celular do microrganismo através da incorporação de compostos que

possibilitarão a redução da carga líquida negativa de sua superfície. Desta forma, gera-se uma repulsão eletroestática dos peptídeos catiônicos impedindo-os de chegar ao alvo (GUILHELMELLI et al., 2013).

- b) Blindagem da superfície:** Moléculas secretadas pelo patógeno ou associadas à sua superfície podem se ligar ao peptídeo antimicrobiano e inativá-lo, impedindo, assim, que este se ligue ao seu alvo e exerça sua função (COLE & NIZET, 2016).
- c) Efluxo ativo:** As bombas de efluxo podem ser acionadas por cassetes de ligação ao ATP (adenosina trifosfato) e são utilizadas para expulsar o peptídeo de seu local de ação dentro da célula de volta para o meio extracelular. Os mecanismos empregados são os mesmos dos descritos para resistência a antibióticos (PIDDOCK, 2006).
- d) Degradação proteolítica:** Os peptídeos antimicrobianos são clivados em unidades menores e não funcionais por proteases produzidas e secretadas por patógenos, desta forma perdendo sua atividade microbicida (SHINNAR; BUTLER; PARK, 2003).

Peptídeos antimicrobianos são relativamente resistentes à degradação proteolítica, mas há relatos de proteases bacterianas com amplo espectro de atividade que clivam e inativam de forma eficiente tais peptídeos. O peptídeo antimicrobiano LL-37 é clivado em fragmentos não-funcionais por proteases expressas por diversos patógenos dentre os quais *Enterococcus faecalis* (metaloprotease gelatinase), *Streptococcus* do Grupo A (GAS) (protease SpeB), *Staphylococcus aureus* (aureolisina), *Proteus mirabilis* (metaloprotease de 50 kDa), *Pseudomonas aeruginosa* (elastase) (SCHMIDTCHEN et al., 2002; BELAS; MANOS; SUVANASUTHI, 2004; SIEPRAWSKA-LUPA et al., 2004; JOHANSSON et al., 2008). A inativação deste peptídeo por tais proteases permite que tais microrganismos sobrevivam em macrófagos (KUBICA et al., 2008) e na circulação (BELAS; MANOS; SUVANASUTHI, 2004).

1.5. O LL-37 COMO ALVO DE PROTEASES SECRETADAS POR *LEPTOSPIRA*

Neste projeto pretende-se ampliar o leque de investigação de possíveis alvos das proteases secretadas por leptospiros patogênicas. Embora exista uma vasta diversidade de peptídeos antimicrobianos, conforme descrito anteriormente, a razão pela qual este estudo aborda especialmente a interação da catelicidina humana com a bactéria *Leptospira* remete a um trabalho publicado anteriormente por LINDOW et al., (2016). No estudo em questão, os autores avaliaram múltiplos parâmetros de pacientes hospitalizados com leptospirose aguda com objetivo de detectar fatores associados aos casos letais da doença. Dentre os parâmetros destacáveis dos resultados, estava o LL-37, cujos baixos níveis séricos foram associados a maior carga bacteriana e a casos fatais. Embora os dados sejam importantes para propor a catelicidina como uma abordagem terapêutica, há ainda vertentes não elucidadas, como por exemplo, as razões subjacentes aos baixos níveis de catelicidina nesses pacientes que vieram a óbito.

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo principal avaliar a degradação de LL-37 pela bactéria *Leptospira*, fato que, eventualmente, poderia explicar os menores níveis deste peptídeo antimicrobiano em casos humanos letais da doença. Acreditamos que este projeto possa, eventualmente, contribuir para o futuro desenvolvimento de estratégias terapêuticas e/ou preventivas que possam interferir no processo de invasão e destruição tecidual observados na leptospirose.

2. OBJETIVO

Avaliar o papel de proteases secretadas por *Leptospira* na degradação e inativação do peptídeo antimicrobiano LL-37.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação de sorovares patogênicos e não patogênicos de *Leptospira* quanto à capacidade de secretar protease(s) que degradam o peptídeo antimicrobiano LL-37.
- Identificação da natureza das proteases envolvidas através do uso de inibidores específicos: fluoreto de fenilmetilsulfonilo (inibidor de proteases de serina), 1,10-fenantrolina (inibidor de metaloproteases), E-64 (inibidor de proteases de cisteína) e pepstatina (inibidor de proteases de ácido aspártico).
- Avaliação da capacidade de proteases candidatas secretadas (termolisina e papalisina) de degradar o LL-37.
- Avaliação da degradação de outros quatro peptídeos antimicrobianos: as α -defensinas HNP-1 e 2 e as β -defensinas 1 e 2.
- Comparação da atividade antibacteriana de LL-37 sobre estirpes de *Leptospira* patogênica e saprófita utilizadas neste estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SOLUÇÕES E REAGENTES

❖ **Meio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) modificado:**

Para cultivo das diversas estirpes de *Leptospira* foi utilizado o meio EMJH (Difco™ Laboratories, Sparks, Maryland, EUA) enriquecido de L-asparagina (0,015%), piruvato de sódio (0,001%), cloreto de cálcio (0,001%), cloreto de magnésio (0,001%), peptona (0,03%) e extrato de carne (0,02%), previamente autoclavado a 120°C por 20 minutos e suplementado com 10% de soro de coelho inativado a 56 °C por 30 min, esterilizado por filtros com poros de 0,22 µm.

❖ **Reagentes para gel de dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida (SDS-PAGE):**

Acrilamida 30% (acrilamida 29% e N,N'-metilenobisacrilamida 1%), tampão Tris-HCl pH 8,8 (Tris-HCL 1,5 M e SDS 0,1%, pH 8,8), tampão Tris-HCl pH 6,8 (Tris-HCL 0,5 M e SDS 0,1%, pH 6,8), solução de persulfato de amônio (persulfato de amônio 10%), TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina).

❖ **Tampões:**

Phosphate Buffered Saline (PBS): NaCl 1,37M, KCl 0,027 M, Na₂HPO₄ 0,10 M e KH₂PO₄ 0,017 M) pH 7,4.

Tampão de amostra 5x: Tris-HCl 50 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 100 mM e SDS 2%.

Tampão de corrida: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3.

Tampão Chaps: Tris HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ e 0,05 % Chaps pH 7,4.

Tampão Tris HCl: Tris HCl 20 mM, CaCl₂ 1mM, pH 7,8.

❖ **Soluções para coloração por prata:**

Solução fixadora: 50% etanol, 12% ácido acético e 0,05% formaldeído 37%.

Solução álcool: etanol 30%.

Solução de tiosulfato de sódio: 0,02% Na₂S₂O₃.

Solução corante: 0,1% AgNO₃ e 0,075% formaldeído 37%.

Solução reveladora: 2% Na₂CO₃ e 0,05% formaldeído 37%.

Solução stop: 50% etanol e 12% ácido acético.

3.2. SOROVARES DE *LEPTOSPIRA* E CONDIÇÕES DE CULTIVO

No presente trabalho foram utilizados os seguintes sorovares apresentados no Quadro 1:

Espécies de <i>Leptospira</i>	Virulência
<i>L. interrogans</i> sorovar Kennewicki estirpe Fromm (LPF)	Patogênica
<i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 (L1-130)	Patogênica
<i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni estirpe 10A (Cop 10A)	Patogênica
<i>L. kirschneri</i> sorovar Cynopteri estirpe 3522C (Cynopteri)	Patogênica
<i>L. biflexa</i> sorovar Patoc estirpe Patoc I (Patoc)	Saprófita
<i>L. biflexa</i> sorovar Andamana estirpe CH11 (Andamana)	Saprófita

Fonte: Oliveira, P.N (2020)

As estirpes LPF e L1-130 são patogênicas e têm sua virulência preservada por passagens sucessivas em hamsters. As estirpes Cop 10A e Cynopteri foram atenuadas em cultura e as estirpes Patoc e Andamana são saprófitas, não-patogênicas.

As bactérias são regularmente mantidas no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) e foram gentilmente cedidas para este projeto. Em nosso laboratório, as bactérias foram cultivadas em meio EMJH modificado e mantidas em temperatura entre 28 a 30°C por um período de sete dias.

3.3. OBTENÇÃO DE SOBRENADANTES DAS CULTURAS DE *LEPTOSPIRA*

Após 7 dias de cultivo realizou-se a contagem em microscópio de campo escuro utilizando-se a câmara de Petroff-Hausser para averiguação da viabilidade das bactérias. Posteriormente, fez-se a centrifugação dessas amostras por 25 minutos em temperatura ambiente, seguida por duas lavagens em PBS pH 7,4. As bactérias foram ressuspensas em PBS pH 7,4 de forma a se obter 1×10^9 células. As amostras foram incubadas por 4 horas em estufa a 37°C para que ocorresse a secreção de proteases. Ao final deste período as amostras passaram por nova centrifugação por 25 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram coletados, filtrados em membranas de 0,22 µm, e armazenados em -80°C para serem utilizados nos ensaios subsequentes.

O *Kit BCA Protein Assay* (Pierce) foi utilizado para realizar a dosagem da concentração total das proteínas presentes nos sobrenadantes de cultura das leptospiras e das metaloproteases termolisina e papalisina.

3.4. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO: TERMOLISINA E PAPALISINA RECOMBINANTES

A expressão e purificação das metaloproteases termolisina e papalisina foram realizadas por outras alunas do grupo em colaboração com as Dras. Rosa Chura-Chambi e Ligia Morganti do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

A termolisina NprT de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, codificada pelo gene LIC13322, possui sequência sinal para secreção, pró-domínios FTP e PepSY e domínios catalíticos Peptidase_M4 e Peptidase_M4_C com sítio ativo HEXXH dependente de zinco. Uma construção que contém o pró-domínio PepSY e os domínios catalíticos Peptidase_M4 foi utilizada para gerar a proteína recombinante, que tem peso molecular de 75 kDa. A papalisina "*pappalysin-1 domain protein*", de peso molecular de 50 kDa e codificada pelo gene LIC13434, é uma protease da família M23, que também é dependente de zinco.

As duas proteínas foram expressas na fração insolúvel e foram então solubilizadas e renaturadas utilizando-se a tecnologia de alta pressão hidrostática

(CHURA-CHAMBI et al., 2019). Por fim, foram aplicadas em colunas de exclusão molecular e as proteases purificadas foram coletadas e mantidas a -80°C até a realização dos testes funcionais.

3.5. TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

3.5.1. Eletroforese em gel de SDS-PAGE

As proteínas foram separadas por eletroforese utilizando-se géis de 1,0 milímetro de espessura, 5% de bisacrilamida/acrilamida no gel de empilhamento e 12 ou 15% de bisacrilamida/acrilamida nos géis de separação (LAEMMLI, 1970). Às amostras foi adicionado tampão de amostra (5x), e realizou-se desnaturação a 96°C por 3 minutos. As eletroforeses foram realizadas em tampão de corrida, empregando-se voltagens de 80 e 120 volts nos géis de empilhamento e de corrida, respectivamente, à temperatura ambiente. Utilizou-se o padrão de massa molecular *Kaleidoscope* (Bio-Rad) em todas as corridas. Após o término da eletroforese, os géis foram corados por prata.

3.6. COLORAÇÃO POR PRATA

Cada solução descrita foi acrescentada em volume suficiente para cobrir os géis e foram descartadas após o término do tempo estipulado de agitação. Primeira etapa: a solução fixadora foi acrescentada e aquecida por 30 segundos em forno de micro-ondas e os géis imersos em solução foram mantidos em agitação por 5 minutos. Segunda etapa: a solução álcool foi acrescentada sobre os géis, e também aquecida por 30 segundos e mantida em agitação por 5 minutos. Terceira etapa: a solução de tiosulfato de sódio foi acrescentada, aquecida por 30 segundos e mantida em agitação por 2 minutos. Quarta etapa: foram realizadas duas lavagens em água destilada. Para cada lavagem a água foi aquecida por 30 segundos e mantida em agitação por 2 minutos. Quinta etapa: a solução corante foi acrescentada e aquecida por 30 segundos e a agitação foi mantida por 5 minutos. Em seguida, os géis passaram por outra lavagem em água destilada e manteve-se em agitação por 1 minuto. Após esta etapa, foi adicionada a solução reveladora, a

agitação foi mantida até o aparecimento das bandas nos géis. Com o surgimento das bandas de interesse, a coloração foi interrompida pelo acréscimo da solução *stop*, mantida em agitação por 30 segundos.

3.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROTEASES PRESENTES NOS SECRETADOS DE LEPTOSPIRAS SOBRE O PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO LL-37

A atividade proteolítica de proteases presentes nos sobrenadantes de leptospiiras sobre a catelicidina humana (LL-37), gentilmente fornecida pelo Dr. Elsie A. Wunder Jr. da Yale Institute for Global Health, Estados Unidos (EUA). Os ensaios foram realizados incubando-se 5,0 µg de proteínas dos sobrenadantes de cultura com 4,0 µg do peptídeo antimicrobiano LL-37 em um volume total da reação de 25 µl. As incubações foram feitas nos tempos de 0, 1, 4, 7 e 20 horas, em banho seco à temperatura de 37°C para simular as condições do hospedeiro. Como controles negativos foram incluídos apenas o peptídeo ou o sobrenadante de cultura bacteriano, ambos em tampão PBS pH 7,4. Os ensaios foram realizados em triplicata para todas as estirpes avaliadas. Do mesmo modo, para avaliar a atividade proteolítica das proteases (termolisina e papalisina) sobre o LL-37 foi realizada incubação de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 µg da termolisina em tampão Tris HCl e 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 µg da papalisina em tampão Chaps com 4,0 µg da catelicidina em um volume total da reação de 25 µl. A incubação foi feita pelo tempo de 24 horas, em banho seco à temperatura de 37°C. Os produtos de clivagem do LL-37 foram visualizados em géis de SDS-PAGE 15% corados por prata.

3.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROTEASES PRESENTES NO SECRETADO DE *LEPTOSPIRA* SOBRE OUTROS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

De forma análoga ao ensaio realizado com a catelicidina humana, foram testados outros quatro peptídeos antimicrobianos, sendo eles as α -defensinas HNP-1 e 2 e as β -defensinas 1 e 2. Para avaliar a atividade das proteases presentes no

sobrenadante de *Leptospira* sobre os novos alvos, foram feitas incubações de 5,0 µg de proteínas do sobrenadante de cultura de *Cynopteri* com 1,0 µg de cada peptídeo antimicrobiano em um volume total da reação de 25 µl. As incubações foram feitas nos tempos de 0, 4 e 20 horas, em banho seco à temperatura de 37°C para simular as condições do hospedeiro. Como controles negativos foram incluídos apenas o peptídeo ou o sobrenadante de cultura bacteriano, ambos em tampão PBS pH 7,4. Os produtos de clivagem dos PAMs foram visualizados em géis de SDS-PAGE 15% corados por prata.

3.9. IDENTIFICAÇÃO DA CLASSE DE PROTEASES ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DO PEPTÍDEO LL-37 PELO USO DE INIBIDORES ESPECÍFICOS

Os secretados das estirpes em estudo (5 µg) foram previamente incubados com diferentes classes de inibidores de proteases (Quadro 2) por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado o peptídeo LL-37 (4 µg) e as reações permaneceram em incubação nas mesmas condições acima descritas por 24 horas. Como controles negativos foram incluídos apenas o peptídeo ou o sobrenadante de cultura bacteriano, ambos em PBS pH 7,4, e como controle positivo foi adicionado um ponto contendo o peptídeo juntamente com o secretado de uma determinada estirpe. A inibição das clivagens foi analisada por eletroforese em gel de SDS-PAGE 15%, seguido da coloração por prata.

Quadro 2 - Classes de inibidores de proteases utilizadas no ensaio

Inibidor	Classe de proteases inibidas	Concentração final
Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Proteases de Serina	5 mM
1,10-fenantrolina	Metaloproteases	5 mM
E-64	Proteases de Cisteína	28 µM
Pepstatina	Proteases de ácido aspártico	5 µM

Fonte: OLIVEIRA, P.N (2020).

3.10. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Neste ensaio, avaliamos a atividade antibacteriana do peptídeo LL-37. Para tal, empregamos o teste de redução da resazurina. O Alamar Blue® (resazurina) é um corante azul e não fluorescente. Porém, quando adicionado em um meio contendo células viáveis este é reduzido, provavelmente, por uma reação de consumo de oxigênio, tornando-se um corante fluorescente rosa (O'BRIEN et al., 2000). Sendo assim, as estirpes LPF (virulenta) e Patoc (saprófita) foram cultivadas durante 7 dias a 28 - 30 °C em meio EMJH modificado. Após este período realizou-se a contagem das bactérias em microscópio de campo escuro utilizando-se a câmara de Petroff-Hausser. Em seguida, $6,0 \times 10^6$ células foram adicionadas a tubos *eppendorf* juntamente com diferentes concentrações de LL-37, sendo elas 3; 6; 12; 25; 37,5; 50 µM. As reações foram então incubadas por 2 horas a 37 °C e após este período foram adicionados 20 µL do reagente Alamar Blue ® (resazurina). Os *eppendorfs* foram acondicionados em papel alumínio e as reações foram mantidas em estufa nas mesmas condições descritas anteriormente por mais 2 horas. Após este período 100 µl das reações foram transferidas para placas de microtitulação de 96 poços para leitura. A presença de células viáveis foi detectada por meio de filtros que permitiram a leitura da absorbância em dois comprimentos de onda: 550 nm e 595 nm. Para calcular a porcentagem de inibição celular, foi utilizado o seguinte cálculo:

Amostra	Abs 550 nm	Abs 595 nm
100 µl de meio com 10% resazurina	A	X
100 µl de meio	B	Y
Total	(AO _{LW}) A - B	(AO _{HW}) X - Y

$$\text{Fator de correção (RO)} = AO_{LW}/AO_{HW}$$

$$\% \text{ Células vivas} = \frac{A_{LW} - (A_{HW} \times R_O) \text{ do poço teste}}{A_{LW} - (A_{HW} \times R_O) \text{ do controle de crescimento}} \times 100$$

$$\% \text{ Inibição} = 100\% - \% \text{ células vivas}$$

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste *t-Student* para amostras independentes foi utilizado para comparar a atividade proteolítica dos sobrenadantes das estirpes de *Leptospira* nos diferentes períodos de incubação em relação ao T_0 e também no ensaio de atividade antibacteriana da catelicidina humana sobre as culturas de *Leptospira* patogênica e saprófita. Adotou-se um valor de $P < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 6.

4. RESULTADOS

4.1. PROTEASES SECRETADAS POR LEPTOSPIRAS: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

No presente trabalho seis estirpes de *Leptospira* foram selecionadas para serem avaliadas quanto sua capacidade de secretar proteases envolvidas na degradação da catelicidina humana. As estirpes foram mantidas em meio EMJH durante sete dias em temperaturas de 28 a 30 °C, quando atingiram a fase estacionária. Na Figura 9 são mostrados os perfis eletroforéticos de proteínas secretadas pelas seis estirpes, obtidas a partir de 1×10^9 bactérias incubadas em PBS por 4 horas a 37 °C. É possível observar diferenças no perfil proteico dos sobrenadantes das estirpes no que diz respeito à composição e número de bandas. Os perfis das duas estirpes saprófitas são bastante similares entre si, mas diferem daqueles exibidos pelas estirpes atenuadas (Cop 10A e Cynopteri) ou virulentas (L1-130 e LPF).

Figura 9 - Perfil eletroforético dos sobrenadantes de estirpes de leptospiiras

As proteínas foram obtidas a partir de 1×10^9 bactérias incubadas por 4 horas a 37 °C. As proteínas secretadas foram solubilizadas em tampão redutor, desnaturadas e analisadas por SDS-PAGE 12%. O gel foi corado por prata. (M) Marcador de massa molecular *Kaleidoscope* (Bio-Rad); (1) *L. biflexa* sorovar Patoc I; (2) *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11; (3) *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 10A; (4) *L. kirschneri* sorovar Cynopteri estirpe 3522C; (5) *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130; (6) *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm. Fonte: OLIVEIRA, P.N (2020).

4.2. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROTEASES PRESENTES NOS SECRETADOS DE LEPTOSPIRAS SOBRE A CATELICIDINA HUMANA

Para avaliar o efeito das proteases presentes nos sobrenadantes das leptospiiras saprófitas e patogênicas foram realizados ensaios proteolíticos utilizando o peptídeo antimicrobiano LL-37 como alvo. Os resultados demonstram que proteases presentes nos sobrenadantes de leptospiiras patogênicas (tanto virulentas quanto atenuadas em cultura) (Figura 10A - D) possuem a capacidade de clivar o peptídeo, que migra como uma banda de 4 kDa. A clivagem é mais eficiente conforme o aumento do tempo de incubação, ou seja, a clivagem ocorre de forma tempo-dependente (Gráfico 1). Por outro lado, as proteases dos sobrenadantes das espécies saprófitas não apresentaram capacidade de clivar o peptídeo em nenhum dos tempos propostos no ensaio (Figura 10E e F, Gráfico 1). O ensaio foi realizado em triplicata para cada sobrenadante das estirpes em estudo e um ensaio representativo de três é mostrado no Gráfico 1. Análises de densitometria foram realizadas a partir da média dos três ensaios com o *software* Alliance HD 6 v16.15 UVITEC (Gráficos de barras à direita).

Figura 10 - Avaliação da atividade proteolítica dos secretados de leptospiros sobre a catelicidina humana

Os secretados bacterianos foram incubados com o peptídeo antimicrobiano LL-37 por diferentes tempos (0, 1, 4, 7 e 20 horas) a 37 °C. A degradação do peptídeo foi analisada por SDS-PAGE 15%. Os géis foram corados por prata (à esquerda) e o peptídeo LL-37 (4 kDa) está indicado por uma seta. As análises de densitometria foram realizadas a partir da média dos três ensaios com o *software*

Alliance HD 6 v16.15 UVITEC (à direita). (*) $P < 0,05$ segundo o teste t-Student para amostras independentes. (M) Marcador de massa molecular *Kaleidoscope* (Bio-Rad); (A.1 e A.2) *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm; (B.1 e B.2) *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130; (C.1 e C.2) *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 10A; (D.1 e D.2) *L. kirschneri* sorovar Cynopteri estirpe 3522C; (E.1 e E.2) *L. biflexa* sorovar Patoc I; (F.1 e F.2) *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11. Fonte: OLIVEIRA, P.N (2020).

Gráfico 1 - Degradação proteolítica do peptídeo LL-37 por secretado de estirpes de leptospiras ao longo do tempo

O gráfico demonstra a média dos ensaios (realizados em triplicata). A quantificação foi realizada com o software Alliance HD 6 v16.15 UVITEC. Fonte: OLIVEIRA, P.N (2020).

Tabela 1 - Média e o desvio padrão (SD) dos ensaios (realizados em triplicata) apresentados no Gráfico 1

	Ensaio de degradação proteolítica									
	0h		1h		4h		7h		20h	
	Média (%)	SD (%)	Média (%)	SD (%)	Média (%)	SD (%)	Média (%)	SD (%)	Média (%)	SD (%)
Estirpe:										
Andamana	100	0	95,0	28,3	100	53,1	100	11,5	86,5	51,9
Patoc	100	0	100	12,2	81,5	46,8	95,2	23,0	100	9,60
Cop 10A	100	0	100	13,4	100	29,9	78,2	61,6	16,9	12,2
Cynopteri	100	0	30,8	13,3	18,5	10,3	16,0	0,90	16,2	11,4
L1-130	100	0	100	45,1	100	38,1	43,2	14,9	26,9	12,7
LPF	100	0	78,0	32,6	49,3	38,4	34,6	25,3	23,2	15,2

Fonte: OLIVEIRA, P.N (2020).

4.3. IDENTIFICAÇÃO DA NATUREZA DAS PROTEASES ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DO PEPTÍDEO LL-37 PELO USO DE INIBIDORES ESPECÍFICOS

Visto que há proteases secretadas por leptospiros patogênicos capazes de degradar o LL-37, foram testados inibidores das quatro classes principais, sendo elas: proteases de serina (PMSF), metaloproteases (1,10-fenantrolina), proteases de cisteína (E-64) e proteases de ácido aspártico (pepstatina). Neste ensaio, os sobrenadantes de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130, *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 10A e *L. kirschneri* sorovar Cynopteri estirpe 3522C foram pré-incubados com cada inibidor por 30 minutos a 37 °C. Após este período o peptídeo foi adicionado às reações e mantiveram-se as incubações a 37 °C por 24 horas. Os resultados demonstram que dentre todos os inibidores utilizados apenas a 1,10 fenantrolina foi capaz de impedir a degradação do peptídeo (Figura 11), sugerindo assim que o processo de degradação da catelicidina ocorre por metaloproteases presentes nos secretados dessas estirpes.

Figura 11 - Identificação da classe de proteases envolvidas na degradação do peptídeo antimicrobiano LL-37

Os secretados bacterianos foram pré-incubados durante 30 minutos a 37 °C com os seguintes inibidores: PMSF 5 mM (proteases de serina), 1,10-fenantrolina 5 mM (metaloproteases), E-64 28 µM (proteases de cisteína) e pepstatina 5 µM (proteases de ácido aspártico). Posteriormente, foram acrescentadas às reações o peptídeo LL-37 e as incubações prosseguiram a 37 °C por 20 horas. A inibição das clivagens foi analisada por SDS-PAGE 15%. Os géis foram corados por prata e o peptídeo LL-37 (4 kDa) está indicado por uma seta. (M) Marcador de massa molecular *Kaleidoscope* (Bio-Rad); Sobrenadantes de (A) *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm; (B) *L. interrogans*

sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130; (C) *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 10A e (D) *L. kirschneri* sorovar Cynopteri estirpe 3522C. Fonte: OLIVEIRA, P.N (2020).

4.4. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROTEASES PRESENTES NO SECRETADO DE *LEPTOSPIRA* SOBRE OUTROS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Tendo em vista que apenas os sobrenadantes das estirpes patogênicas foram capazes de degradar a catelicidina, realizamos um novo ensaio semelhante, porém agora avaliando outros quatro peptídeos antimicrobianos (β -defensina 1 e 2; e α -defensinas HNP-1 e 2). Neste novo ensaio foi testado apenas o secretado da estirpe Cynopteri, devido sua alta eficiência em degradar o LL-37 quando comparada às outras estirpes. Os resultados demonstram que proteases presentes nos sobrenadantes da estirpe em questão não apresentaram capacidade de degradar nenhum dos peptídeos testados independentemente do tempo de incubação (Figura 12A - D). O ensaio foi realizado em duplicata para cada peptídeo antimicrobiano em estudo e um ensaio representativo de dois é mostrado na Figura 12.

Figura 12 – Atividade proteolítica de proteases presentes no secretado de *Leptospira* sobre outros peptídeos antimicrobianos

O secretado bacteriano foi incubado com os peptídeos antimicrobianos (defensinas) por diferentes tempos (0, 4 e 20 horas) a 37 °C. A degradação dos peptídeos foi analisada por SDS-PAGE 15%. Os géis foram corados por prata e os peptídeos (Beta e Alfa defensinas) estão indicados por uma seta. (M) Marcador de massa molecular *Kaleidoscope* (Bio-Rad); (A) β - defensina 1; (B) β - defensina 2; (C) α - defensina HNP-1; (D) α - defensina HNP-2. Fonte: OLIVEIRA, P.N (2020).

4.5. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DAS METALOPROTEASES TERMOLISINA E PAPALISINA SOBRE A CATELICIDINA HUMANA

O efeito das metaloproteases candidatas termolisina e papalisina recombinantes sobre a catelicidina humana também foi avaliado. Dos resultados obtidos, é possível concluir que ambas as proteases não apresentam capacidade de degradar o peptídeo antimicrobiano LL-37 (Figura 13). Portanto, outras metaloproteases presentes nos sobrenadantes são responsáveis pela degradação observada nos ensaios anteriores.

Figura 13 - Avaliação da atividade proteolítica das proteases termolisina e papalisina recombinantes sobre a catelicidina humana

As proteases termolisina e papalisina recombinantes foram incubadas em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 µg) com o peptídeo antimicrobiano LL-37 pelo tempo de 24 horas a 37 °C. A atividade proteolítica foi analisada por SDS-PAGE 15%. Os géis foram corados por prata e o peptídeo LL-37 (4 kDa) está indicado por uma seta. (M) Marcador de massa molecular *Kaleidoscope* (Bio-Rad); (A) Termolisina; (B) Papalisina. Fonte: OLIVEIRA, P.N (2020).

4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA CATELICIDINA HUMANA

Realizamos um ensaio de viabilidade celular empregando a resazurina para avaliar a atividade antibacteriana da catelicidina humana sobre as estirpes *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (LPF) e *L. biflexa* sorovar Patoc I (Patoc), patogênica e saprófita, respectivamente. Os resultados demonstram que em concentrações ≥ 25 µM de LL-37 ambas as estirpes são suscetíveis à ação do peptídeo e, por outro, em concentrações ≤ 6 µM ambas sobrevivem. A diferença na

taxa de sobrevivência é notada quando se usa 12 μM de LL-37, quando é possível observar que a estirpe saprófita demonstra sensibilidade à ação do peptídeo, tendo sua sobrevivência reduzida à metade, ao contrário da estirpe patogênica, que não apresenta mortalidade nesta mesma concentração (Figura 14; Gráfico 2). Neste ensaio foram realizadas seis repetições para cada estirpe em estudo e um ensaio representativo dos seis é mostrado na Figura 14. As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 6 segundo o teste *t-Student* para amostras independentes. O resultado é apresentado no Gráfico 2.

Figura 14 - Avaliação da atividade antibacteriana da catelicidina humana sobre as estirpes LPF (patogênica, virulenta) e Patoc (saprófito) de *Leptospira*

$6,0 \times 10^6$ células da estirpe patogênica e saprófita de *Leptospira* foram incubadas com diferentes concentrações (50; 37,5; 25; 12; 6 e 3 μM) do peptídeo antimicrobiano LL-37 pelo tempo de 4 horas a 37 °C. As detecções de células viáveis foram realizadas pela leitura da absorbância em dois comprimentos de onda: 550 nm e 595 nm. A avaliação da viabilidade celular foi feita utilizando-se o corante Alamar Blue, onde: Azul indica morte celular e Rosa indica atividade celular. Fonte: OLIVEIRA, P.N (2020).

Gráfico 2 - Avaliação da atividade antibacteriana da catelicidina humana sobre as estirpes LPF (patogênica) e Patoc (saprófita) de *Leptospira*

6,0 x 10⁶ células da estirpe saprófita (Patoc) e patogênica (LPF) de *Leptospira* foram incubadas com diferentes concentrações (3; 6; 12; 25; 37,5 e 50 µM) do peptídeo antimicrobiano LL-37 pelo tempo de 4 horas a 37 °C. As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 6 segundo o teste *t-Student* para amostras independentes. (****) $P < 0,05$ e (ns) Não Significativo. O gráfico demonstra a média dos ensaios (realizados em seis repetições). Fonte: OLIVEIRA, P.N (2020).

5. DISCUSSÃO

Os peptídeos antimicrobianos fazem parte do nosso sistema imunológico de defesa (BOMAN, 2003). São produzidos por animais e humanos sendo um dos componentes da imunidade inata. Sua atividade gera danos, principalmente por desestabilização da membrana bacteriana devido à carga positiva que possuem (PESCHEL et al., 1999). Entretanto, diversos estudos reportam aparatos que as bactérias desenvolveram para driblar esta barreira do organismo do hospedeiro.

Neste projeto, foi demonstrada a degradação da catelicidina por proteases presentes no secretado de estirpes patogênicas de *Leptospira*. Outros estudos do grupo vêm demonstrando a importância de proteases secretadas por estirpes patogênicas de *Leptospira* na degradação de componentes do sistema imune e de moléculas da matriz extracelular e da cascata de coagulação. Fraga e colaboradores (2014) observaram atividade proteolítica no sobrenadante de cultura de leptospiros patogênicas sobre componentes do sistema complemento, tais como o C3, o fragmento iC3b, Fator B (proteína da via alternativa) e moléculas das vias clássica e das lectinas: C4, C4b e C2. Amamura e colaboradores (2017) analisaram a atividade das proteases de leptospiros sobre os componentes do complexo de ataque à membrana (MAC) da via terminal do sistema complemento e observaram clivagem das proteínas purificadas C5, C6, C7, C8 e C9 por estirpes patogênicas de forma tempo-dependente. Já Silva e colaboradores (2018) em um estudo avaliando a atividade proteolítica de proteínas presentes no secretado de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm sobre um painel de moléculas da matriz extracelular e do plasma, observaram que houve degradação do fibrinogênio humano, fibronectina plasmática e dos proteoglicanos decorina, biglicam e lumican. Ainda, proteases com atividade gelatinolítica também são secretadas por esta estirpe.

Em todos os casos reportados, a atividade proteolítica das enzimas presentes nos secretados das estirpes patogênicas foi abolida pela 1,10 fenantrolina, um inibidor de metaloproteases, sugerindo o envolvimento desta classe de proteases na degradação dos diversos componentes do hospedeiro, sejam eles integrantes do sistema imune inato, da matriz extracelular ou da cascata de coagulação. No presente estudo, a degradação do peptídeo antimicrobiano LL-37 também foi inibida pela 1,10 fenantrolina, indicando, mais uma vez, a participação de metaloproteases na inativação desta molécula. De posse desse dado, utilizamos duas

metalo proteases candidatas (uma das quatro termolisinas (LIC13322) e a papalisina) disponíveis em nosso laboratório e, do mesmo modo, foram realizados ensaios proteolíticos utilizando a catelicidina como alvo. Diversas concentrações das proteases foram testadas no ensaio, entretanto, o peptídeo antimicrobiano LL-37 se apresentou resistente à ação de ambas as metaloproteases avaliadas. Deste modo, podemos inferir que outras metaloproteases secretadas por estirpes patogênicas de *Leptospira* estejam envolvidas no processo de degradação da catelicidina humana.

Vale aqui ressaltar que, além de leptospiros, há diversas outras bactérias com capacidade de degradar o peptídeo antimicrobiano LL-37. Um estudo feito por Sieprawska-Lupa e colaboradores (2004) examinando a susceptibilidade da catelicidina humana à degradação proteolítica por duas proteases produzidas por *Staphylococcus aureus*, a aureolisina (metalo protease) e a protease V8 (glutamilendopeptidase), demonstraram que a aureolisina foi capaz de clivar e inativar o LL-37, enquanto a protease V8, embora tenha sido capaz de clivar determinada região do peptídeo, não foi eficaz em inativá-lo. Em outra pesquisa realizada com *Staphylococcus aureus*, os autores demonstraram que a estafiloquinase interage diretamente com o plasminogênio e com a catelicidina para potencializar o processo de fibrinólise, configurando-se outro mecanismo de virulência desta bactéria (BRAFF et al., 2007). Em *Streptococcus* Grupo A (GAS), mutantes deficientes da estreptoquinase (Ska) perderam a capacidade de degradar de forma eficiente a catelicidina, e consequentemente foram mais susceptíveis à ação microbicida do peptídeo, comprovando a importância da proteína para evasão das defesas do hospedeiro (HOLLANDS et al., 2012).

Também foi demonstrado por Schmidtchen e colaboradores (2002) que proteases presentes em *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* e *Streptococcus pyogenes* possuem a capacidade de clivar o LL-37 tornando-o inativo. Além disto, os autores também demonstram que o uso de inibidores de metaloproteases bloqueiam a atividade da elastase de *P. aeruginosa*, da protease de *P. mirabilis* e da gelatinase de *E. faecalis*, já o inibidor de proteases de cisteína impede a ação de *S. pyogenes* sobre o LL-37. Portanto, o envolvimento de metaloproteases bacterianas na degradação deste peptídeo antimicrobiano parece ser relativamente frequente.

Este estudo também avaliou o efeito de proteases secretadas por uma das estirpes patogênicas de *Leptospira* utilizadas neste projeto sobre outros quatro

peptídeos antimicrobianos, as β -defensinas 1 e 2 e as α -defensinas HNP-1 e 2. Diferentemente da catelicidina humana, todas as defensinas testadas foram resistentes à ação das proteases presentes no sobrenadante da cultura bacteriana independentemente do tempo de incubação. Outros autores reportaram a resistência de certos patógenos à ação desses peptídeos, fato que evidencia a particularidade de cada patógeno. Brissette e colaboradores (2002), avaliando a atividade das β -defensinas frente à espiroqueta *Treponema denticola*, observaram que os peptídeos não foram capazes de eliminar a bactéria. Carlisle e colaboradores (2009) estudaram a ação de proteases presentes em sobrenadante de cultura de *Porphyromonas gingivalis* sobre alfa e beta defensinas, e verificaram que ambas foram total ou parcialmente degradadas após 30 minutos. Maisetta e colaboradores (2011) avaliando a atividade de proteases presentes também em *Porphyromonas gingivalis*, observaram a degradação da β -defensina 3 de forma dependente de tempo e de concentração. Shelton e colaboradores (2011) demonstraram que a bactéria *Haemophilus influenzae* utiliza o aparato transportador ABC para resistir à ação de peptídeos antimicrobianos e os neutraliza através da protease SapA. Já Belas e colaboradores (2004) testaram a ação da metaloprotease ZapA de *Proteus mirabilis* sobre uma gama de substratos e peptídeos e verificaram que os peptídeos β -defensina 1 e o LL-37 são facilmente degradados pela enzima.

Em bactérias espiroquetas, Sambri e colaboradores (2002) mostraram que as catelicidinas derivadas de ovinos, bovinos, suínos, camundongos e humanos, têm ação rápida sobre as bactérias, porém variável de acordo com o peptídeo e a estirpe avaliados. Para leptospiros, os autores verificaram que dos cinco peptídeos derivados da catelicidina, o SMAP-29 de ovinos e o BMAP-28 de bovinos foram os mais ativos contra sorovares de *L. interrogans*, com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando entre 3 a 51 mg/L (0,75 a 12,75 μ M), dependendo das estirpes estudadas. As CIM das outras catelicidinas variaram entre 4,3 e 224 mg/L (1,08 e 56 μ M).

Visto que nos ensaios proteolíticos realizados no presente estudo observamos degradação da catelicidina humana apenas na presença de proteases secretadas por estirpes patogênicas, realizamos um ensaio para comparar a atividade antibacteriana do LL-37 sobre as estirpes patogênica (LPF) e saprófita (Patoc) de *Leptospira*. De acordo com nossos resultados, a sobrevivência de ambas as estirpes foi comprometida em concentrações de LL-37 iguais ou superiores a 25

μM , e preservada em concentrações iguais ou inferiores a $6 \mu\text{M}$. Todavia, encontramos diferença na taxa de sobrevivência das estirpes na presença do peptídeo na concentração de $12 \mu\text{M}$, quando verificamos redução de 50% na viabilidade da estirpe saprófita e viabilidade total da estirpe patogênica.

No trabalho de Lindow e colaboradores (2016), mencionado na Introdução, os níveis séricos de catelicidina em pacientes hospitalizados com leptospirose foram variáveis: aqueles que sobreviveram apresentaram em média $0,5 \mu\text{g/mL}$ de catelicidina sérica, ao passo que os que vieram a óbito apresentaram $0,3 \mu\text{g/mL}$ de catelicidina. Os autores sugerem que os níveis mais baixos de catelicidina no grupo que veio a óbito estejam correlacionados a cargas bacterianas mais elevadas nestes indivíduos, consequentemente levando a um processo inflamatório mais intenso com danos teciduais importantes e, finalmente, à morte. Vale aqui ressaltar que, segundo Sørensen e colaboradores (1997b), a média de níveis séricos de catelicidina na população saudável é de aproximadamente $1 \mu\text{g/mL}$. Nossa hipótese, portanto, é que mecanismos oriundos do patógeno durante o processo infeccioso, como a secreção de proteases, possam interferir na atividade bactericida do hospedeiro, deixando-o mais suscetível. Nesse sentido, quanto maior a carga bacteriana, maior a concentração de proteases liberadas na circulação e nos tecidos, fato que poderia explicar a redução dos níveis de catelicidina nos casos fatais em que se observam danos teciduais e falência de órgãos. Todavia, para estabelecer uma relação direta entre os níveis do peptídeo antimicrobiano LL-37 e a carga bacteriana na infecção, seriam necessários ensaios *in vivo* com modelos animais.

Em suma, diversas espécies bacterianas produzem proteases como forma de evadir aos mecanismos de defesa do organismo do hospedeiro (POTEMPA; PIKE, 2009). As proteases secretadas por bactérias podem levar à destruição tecidual, propensão hemorrágica e comprometer a eliminação da infecção pelo sistema imune do indivíduo. Deste modo, durante o processo infeccioso, a expressão e secreção de proteases podem proporcionar às bactérias uma vantagem evolutiva sobre as bactérias não secretoras de proteases (KAMAN et al., 2014).

6. CONCLUSÕES

Até o momento, este é o primeiro estudo que avaliou a ação de proteases presentes nos sobrenadantes de leptospiros sobre a catelicidina humana.

Nos ensaios de atividade proteolítica, observamos que houve diferença na atividade das proteases presentes nos secretados preparados a partir de 1×10^9 bactérias sobre o peptídeo LL-37. Nossos achados demonstraram que as proteases do secretado das estirpes patogênicas foram capazes de degradar o LL-37. Em contrapartida, as proteases presentes no secretado das estirpes saprófitas não exerceram ação sobre o peptídeo. Utilizando um ensaio de atividade antibacteriana, demonstramos também que há variação na sensibilidade de duas estirpes de *Leptospira* à ação da catelicidina.

Por fim, a realização de ensaios com modelos animais contribuirá para a validação da ação de proteases secretadas por leptospiros sobre a inativação do LL-37 *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AMAMURA, T. A. et al. Pathogenic *Leptospira* Secreted Proteases Target the Membrane Attack Complex: A Potential Role for Thermolysin in Complement Inhibition. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–16, 30 maio 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00958/full>>.

AMER, L. S.; BISHOP, B. M.; VAN HOEK, M. L. Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 2, p. 246–251, 28 maio 2010.

ARMSTRONG, P. B. Review - Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 263–281, 2006.

BALS, R. et al. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 16, p. 9541–9546, 1998. Disponível em: <www.pnas.org>.

BARBOSA, A. S. et al. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p. 1137–1143, mar. 2009.

BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1529–1539, set. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273606002616>>.

BELAS, R.; MANOS, J.; SUVANASUTHI, R. *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5159–5167, set. 2004.

BERNARD, W. V. Leptospirosis. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 9, n. 2, p. 435–444, 1 ago. 1993.

BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 1 dez. 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1473309903008302>>. Acesso em: 9 fev. 2020.

BOLIN, C. A. et al. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis infection of pregnant cattle. **American journal of veterinary research**, v. 50, n. 1, p. 161–165, jan. 1989. Disponível em: <<http://europemc.org/abstract/MED/2645816>>.

BOMAN, H. G. Antibacterial peptides: Basic facts and emerging concepts. **Journal of Internal Medicine**, 1 set. 2003.

BRAFF, M. H. et al. *Staphylococcus aureus* Exploits Cathelicidin Antimicrobial Peptides Produced during Early Pneumonia to Promote Staphylokinase-Dependent Fibrinolysis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 9, p. 1365–1372, maio 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/513277>>.

BRAFF, M. H.; GALLO, R. L. Antimicrobial Peptides: An Essential Component of the Skin Defensive Barrier. In: **Antimicrobial Peptides and Human Disease**. Springer Berlin Heidelberg, 2006. 306p. 91–110.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de leptospirose**. Brasília: 98 p.1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Saúde. **Casos confirmados e óbitos de leptospirose**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

BRISSETTE, C. A.; LUKEHART, S. A. Treponema denticola is resistant to human β -defensins. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3982–3984, 2002.

BROEKAERT, W. F. et al. Antimicrobial Peptides from Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, n. 3, p. 297–323, 1997.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.

BROT, N.; WEISSBACH, H. Peptide methionine sulfoxide reductase: Biochemistry and physiological role. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 55, n. 4, p. 288–296, 2000.

BÜCHAU, A. S. et al. The Host Defense Peptide Cathelicidin Is Required for NK Cell-Mediated Suppression of Tumor Growth. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 1, p. 369–378, 1 jan. 2010.

CARLISLE, M. D.; SRIKANTHA, R. N.; BROGDEN, K. A. Degradation of human α -And β -defensins by culture supernatants of porphyromonas gingivalis strain 381. **Journal of Innate Immunity**, v. 1, n. 2, p. 118–122, jan. 2009.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M. et al. Plasmin cleaves fibrinogen and the human complement proteins C3b and C5 in the presence of Leptospira interrogans proteins: A new role of LigA and LigB in invasion and complement immune evasion. **Immunobiology**, v. 221, n. 5, p. 679–689, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2016.01.001>>.

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of Leptospira strain typing. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 5, p. 760–768, set. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134809001403>>.

CHURA-CHAMBI, R. M. et al. Protein refolding based on high hydrostatic pressure and alkaline pH: Application on a recombinant dengue virus NS1 protein. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2019.

COLE, J. N. and V. N. Bacterial Evasion of Host Antimicrobial Peptide Defenses. **Microbiol Spectrum**, v. 47, n. 3, p. 549–562, 2016.

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, 17 set. 2015.

COWLAND, J. B.; JOHNSEN, A. H.; BORREGAARD, N. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. **FEBS Letters**, v. 368, n. 1, p. 173–176, 1995.

DENNISON, S. et al. Amphiphilic α -Helical Antimicrobial Peptides and Their Structure / Function Relationships. **Protein & Peptide Letters**, v. 12, n. 1, p. 31–39, 2005.

DI NARDO, A.; VITIELLO, A.; GALLO, R. L. Cutting Edge: Mast Cell Antimicrobial Activity Is Mediated by Expression of Cathelicidin Antimicrobial Peptide. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 5, p. 2274–2278, 1 mar. 2003.

ELLIS, W. A. et al. Bovine leptospirosis: Experimental serovar hardjo infection. **Veterinary Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 293–299, 1986.

FRAGA, T. R. et al. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: The secretion of proteases that directly cleave complement proteins. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 6, p. 876–886, 2014.

FRAGA, T. R. et al. Chapter 107 - *Leptospira* and Leptospirosis. In: TANG, Y.-W. et al. (Ed.). Boston: Academic Press, 2015. p. 1973–1990.

FROHM, M. et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 24, p. 15258–15263, 1997. Disponível em: <<http://www.jbc.org/>>.

GALLO, R. L. et al. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 6, p. 823–831, 1 dez. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674902014616>>.

GANZ, T. et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 4, p. 1427–1435, 1985.

GENNARO, R.; ZANETTI, M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 55, n. 1, p. 31–49, 2000.

GROOMS, D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 624–628, ago. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X0600241X>>.

GUILHELMELLI, F. et al. Antibiotic development challenges: The various

mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Research Foundation, 2013.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: Dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection** Blackwell Publishing Ltd, 2011.

HENRY, R. A.; JOHNSON, R. C. Distribution of the genus *Leptospira* in soil and water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 492–499, 1978. Disponível em: <<http://aem.asm.org/>>.

HIRATSUKA, T. et al. Identification of human β -defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249, n. 3, p. 943–947, 1998.

HOLLANDS, A. et al. A bacterial pathogen co-opts host plasmin to resist killing by cathelicidin antimicrobial peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 49, p. 40891–40897, 30 nov. 2012.

HOWELL, M. D. et al. Selective Killing of Vaccinia Virus by LL-37: Implications for Eczema Vaccinatum. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 3, p. 1763–1767, 1 fev. 2004.

HUANG, H. W. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: The origin of cooperativity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1292–1302, set. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273606000411>>.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.

JIN, F. U. et al. Purification, characterization, and primary structure of *Clostridium perfringens* lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p. 230–237, 1996.

JOHANSSON, J. et al. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 6, p. 3718–3724, 1998. Disponível em: <<http://www.jbc.org/>>.

JOHANSSON, L. et al. Cathelicidin LL-37 in Severe *Streptococcus pyogenes* Soft Tissue Infections in Humans. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 8, p. 3399–3404, 1 ago. 2008. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.01392-07>>.

KAISER, V.; DIAMOND, G. Expression of mammalian defensin genes. **Journal of leukocyte biology**, v. 68, n. 6, p. 779–84, 2000. Disponível em: <<http://www.jleukbio.org>>.

KANDA, N. et al. Increased serum leucine, leucine-37 levels in psoriasis: Positive and negative feedback loops of leucine, leucine-37 and pro- or anti-inflammatory cytokines. **Human Immunology**, v. 71, n. 12, p. 1161–1171, dez. 2010.

KUBICA, M. et al. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: The silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. **PLoS ONE**, v. 3, n. 1, 9 jan. 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/227680a0>>.

LARRICK, J. W. et al. Structural, functional analysis and localization of the human CAP18 gene. **FEBS Letters**, v. 398, n. 1, p. 74–80, 1996.

LEE, C. C. et al. Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37. **Biophysical Journal**, v. 100, n. 7, p. 1688–1696, 6 abr. 2011.

LÉON, A. et al. Identification of pathogenic *Leptospira* strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 2, p. 218–221, 2006.

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

LI, J. et al. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. **Nature Medicine**, v. 6, n. 1, p. 49–55, 2000.

LINDOW, J. C. et al. Cathelicidin Insufficiency in Patients with Fatal Leptospirosis. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 11, 1 nov. 2016.

LIU, P. T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1770–1773, 24 mar. 2006.

MAISETTA, G. et al. Gingipains produced by *Porphyromonas gingivalis* ATCC49417 degrade human- β -defensin 3 and affect peptide's antibacterial activity in vitro. **Peptides**, v. 32, n. 5, p. 1073–1077, 2011.

MALM, J. et al. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4297–4302, 2000.

MERI, T. et al. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. **Microbial Pathogenesis**, v. 39, n. 4, p. 139–147, out. 2005.

NAGAOKA, I. et al. Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. **Inflammation Research**, v. 49, n. 2, p. 73–79, 2000.

NILSSON, M. F. et al. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, p. 2561–2566, 1999.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem**, v. 5426, p. 5421–5426, 2000.

OVERHAGE, J. et al. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4176–4182, set. 2008.

PARK, S. Y. et al. Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 9, p. 6328–36, 1 nov. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18941224>>.

PESCHEL, A. et al. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 13, p. 8405–8410, 1999. Disponível em: <<http://www.jbc.org/>>.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 297–307, 6 maio 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>>.

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

QUAYLE, A. J. et al. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. **American Journal of Pathology**, v. 152, n. 5, p. 1247–1258, 1998.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 6, p. 536–547, dez. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092485790400322X>>.

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

ROHRBACH, B. W. et al. Effect of vaccination against leptospirosis on the frequency, days to recurrence and progression of disease in horses with equine recurrent uveitis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 3, p. 171–179, 2005.

SAMBRI, V. et al. Comparative in vitro activity of five cathelicidin-derived sythetic peptides against *Leptospira*, *Borrelia* and *Treponema pallidum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 895–902, 2002.

SANDERSON, J. M. Peptide–lipid interactions: insights and perspectives. **Org. Biomol. Chem.**, v. 3, n. 2, p. 201–212, 2005. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=B415499A>>.

SCHAUBER, J. et al. Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. **Immunology**, v. 118, n. 4, p. 509–519, ago. 2006.

SCHMIDTCHEN, A. et al. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 157–168, 2002.

SELSTED, M. E. et al. Primary structures of three human neutrophil defensins. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 4, p. 1436–1439, 1985.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 66, n. 4, p. 236–248, 2002. Disponível em: <<http://www.bbcm.univ.trieste.it/tossi/>>.

SHELTON, C. L. et al. Sap transporter mediated import and subsequent degradation of antimicrobial peptides in *Haemophilus*. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 11, nov. 2011.

SHINNAR, A. E.; BUTLER, K. L.; PARK, H. J. Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistance. **Bioorganic Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 425–436, dez. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206803000804>>.

SIEPRAWSKA-LUPA, M. et al. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4673–4679, dez. 2004.

SINGH, P. K. et al. Production of β -defensins by human airway epithelia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 14961–14966, 1998. Disponível em: <www.pnas.org>.

SILVA, L. B. et al. *Leptospira interrogans* Secreted Proteases Degrade Extracellular Matrix and Plasma Proteins From the Host. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. March, 2018.

SØRENSEN, O. et al. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. **Blood**, v. 90, n. 7, p. 2796–2803, 1997a. Disponível em: <www.bloodjournal.org>.

SØRENSEN, O. et al. An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. **Journal of Immunological Methods**, v. 206, n. 1–2, p. 53–59, 1997b.

TANG, Y. Q. et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 498–502, 1999. Disponível em: <www.sciencemag.org>.

TURNER, J. et al. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 9, p. 2206–2214, 1998.

VANDAMME, D. et al. A comprehensive summary of LL-37 , the factotum human cathelicidin peptide. **Cellular Immunology**, v. 280, n. 1, p. 22–35, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.11.009>>.

VIEIRA, M. L. et al. In Vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. 1–13, 2010.

VINCENT, A. T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007270, 23 maio 2019. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007270>>.

YAMASAKI, K. et al. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. **Nature Medicine**, v. 13, n. 8, p. 975–980, ago. 2007.

YANG, D.; CHERTOV, O.; OPPENHEIM, J. J. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 7, p. 978–989, jun. 2001. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/PL00000914>>.

TANG, Y.-W., SUSSMAN, M., LIU, D., POXTON, I., & SCHWARTZMAN, J. (2015). **Molecular medical microbiology**. Amsterdam, Academic Press.

TREMACOLDI, C.R. **Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Plantas Contra Pragas**. 1ª ed. Belém, Pará: Embrapa Amazônia Oriental, 2009.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–395, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/415389a>>.