

ABSTRACT

MATOS, V. R. **Functional characterization of a probable collagenase from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni**. [Caracterização funcional de uma provável colagenase de *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni]. 2014. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Leptospirosis is a zoonosis widespread throughout the world, caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*, which colonize the renal tubules of wild and domestic animals. Transmission occurs mainly through direct contact with water and soil contaminated with urine of infected animals that may be clinically asymptomatic. Pathogenic leptospires invade host tissues by penetrating damaged skin or the mucous membranes of the mouth, nostrils and eyes. Soon after passing the contact surfaces, leptospires come quickly into the bloodstream and spread to all organs causing damage mainly in the liver and kidneys where they produce hemorrhage and tissue necrosis after entering the host, the progression of the infection involves the adhesion of bacteria to eukaryotic cells and extracellular matrix proteins followed by invasion of tissues. Recent studies have shown that leptospires are able to translocate across cell monolayers, which could be a mechanism for evasion of the immune system and also facilitate the entry and exit from the bloodstream to infect target organs. The mechanism involved in pathogen invasion through extracellular barriers is not well elucidated. Enzymes capable of degrading extracellular matrix proteins could contribute to motility and chemotaxis of bacteria during the invasion. Pathogenic bacteria synthesize and secrete different types of proteases that degrade collagen and glycoproteins among other host proteins. Recently, a study using gelatin and casein as substrates and bacterial lysate showed a variety of proteases in *Leptospira* spp. Analysis of the genome indicate the presence of several genes encoding probable protease. The experimental proof of the existence and functional characterization of these proteins may contribute to the understanding of the pathogenesis of leptospirosis. In this sense, this work aimed the cloning, expression and functional characterization of a probable collagenase (ColA) from *L.interrogans* serovar Copenhageni. Coding sequences of the collagenase domain 1 (D1), collagenase domain 2 (D2), and both domains (*Full*) of the ColA gene were amplified by PCR from genomic *Leptospira* DNA and cloned into the pAE expression vector. The D1, D2 and *Full* fragments of ColA protein were expressed in *E. coli* BL21-SI and purified from the insoluble fractions by nickel affinity chromatography. The purified fragments were used to obtain the polyclonal antiserum, and their enzymatic activities were evaluated by zymography. Rabbit polyclonal

antiserum against the recombinant protein fragments were produced with a high antibody level detected by ELISA. *Western-blotting* experiments demonstrated the presence of ColA protein in different pathogenic serovars of *Leptospira*. The *Full* and D2 proteins showed catalytic activity on denatured collagen and synthetic peptide and hemorrhagic activity in mice. These results indicated that ColA is probably a leptospiral protein involved in invasion of host tissues.

Key-words: Leptospirosis. Leptospiras. Proteases. Collagenases.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVO	27
2.1	OBJETIVO GERAL	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	ESTIRPES BACTERIANAS	29
3.2	CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE PROTEÍNA RECOMBINANTE	30
3.2.1	<i>análise in silico</i> e estratégia de clonagem	30
3.2.2	expressão e purificação das proteínas recombinantes	33
3.3	ELETROFORESE EM GEL SDS-PAGE	34
3.4	OBTENÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL EM COELHOS E TESTES DE IMUNOGENICIDADE.....	35
3.5	ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	36
3.5.1	zimografia	36
3.5.2	Pz-peptidase	37
3.6	ATIVIDADE HEMORRÁGICA	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	<i>ANÁLISE in silico</i>	39
4.2	CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E TESTE DE IMUNOGENICIDADE	42
4.3	ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PURIFICADAS	47
4.4	EXPRESSÃO DA ColA NATIVA EM EXTRATOS DE <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni	54
4.5	CONSERVAÇÃO DA PROTEÍNA ColA EM DIFERENTES SOROVARES DE <i>Leptospira</i> spp	55
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PURIFICADAS	58
5	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose, amplamente difundida pelo mundo, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que colonizam os túbulos renais proximais de animais silvestres e domésticos. A transmissão ocorre, principalmente, pelo contato direto com água, alimentos e solo contaminados com urina de animais infectados que podem ser clinicamente assintomáticos (FARR, 1995; BARTHI et al., 2003).

Em áreas urbanas, os principais reservatórios das leptospirosas são os roedores sinantrópicos das espécies *Rattus norvegicus* (rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato de telhado) e *Mus musculus* (camundongo). Os seres humanos são hospedeiros acidentais e a transmissão entre pessoa é rara, apesar das leptospirosas serem eliminadas por vários meses após a infecção (LEVETT, 2001).

Nos países em desenvolvimento, a leptospirose é um dos principais problemas de saúde pública, pois está diretamente relacionada a condições inadequadas de moradia, ausência de saneamento básico e à alta infestação por roedores infectados. A incidência desta doença é significativamente mais alta em países tropicais, uma vez que o clima quente e úmido favorece a sobrevivência das leptospirosas. A infecção em humanos está principalmente relacionada às enchentes e exposições ocupacionais, recreativas e esportivas (KO et al., 1999; LOMAR; DIAMENT; TORRES, 2000; LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003; REIS, 2008). No Brasil, a leptospirose é considerada uma doença re-emergente devido ao aumento do número de ocorrências graves com cerca de 10.000 casos por ano (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

As leptospirosas pertencem ao gênero *Leptospira*, família *Leptospiraceae* e ordem *Spirochaetales* (FAINE et al., 1999). Até 1989, o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies pela classificação fenotípica, *L. interrogans* e a *L. biflexa* que correspondiam a todas as estirpes patogênicas e saprófitas respectivamente (LEVETT, 2001). Posteriormente, o gênero foi reclassificado, com base em análises de hibridação DNA-DNA e outras técnicas moleculares, constituindo diferentes espécies genômicas. São conhecidas nove espécies patogênicas: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. kirschneri*, *L. alexanderi*, *L. genospecies 1* e *L. wolffii*. Quatro espécies ainda não estão definidas quanto à patogenicidade: a *L. inadai*, *L. fainei*, *L. broomii* e *L. licerasiae*. E seis são saprófitas: *L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. genospecies 3*, 4 e 5 (YASUDA et al., 1987; BRENNER et al., 1999; FAINE et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). A *L.*

interrogans predomina como a espécie que mais causa leptospirose em seres humanos em todo o mundo (LEVETT, 2001).

As leptospiras são bactérias aeróbias que utilizam álcoois e ácidos graxos como fontes de carbono e energia. Possuem membrana citoplasmática e parede celular, sendo esta envolta por uma membrana externa contendo proteínas como lipoproteínas e porinas, que permitem as trocas de solutos entre o espaço periplasmático e o meio ambiente (MURRAY et al., 2000).

A mobilidade da bactéria está associada a dois flagelos com localização periplasmática. Sendo altamente móveis, as leptospiras podem penetrar através da pele lesada ou mucosas da boca, narinas e olhos ou pela pele intacta quando imersa em água durante longo período. Logo após ultrapassar as superfícies de contato, as leptospiras chegam rapidamente à corrente sanguínea e espalham-se para todos os órgãos causando lesões, principalmente, no fígado e rins onde produzem hemorragia e necrose tecidual (VINETZ, 2001).

As manifestações clínicas da leptospirose humana são muito variáveis, podendo ocorrer desde quadros assintomáticos até mais graves com disfunção de múltiplos órgãos (LEVETT, 2001; BARTHI et al., 2003). Na maioria dos casos, duas fases distintas de sintomas podem ser observadas. Na fase aguda ou septicêmica, o paciente apresenta febre alta, dores de cabeças, mialgias. A seguir, pode ocorrer um período com aparente melhora. Posteriormente, a fase imune inicia-se com o retorno do estado febril, produção de anticorpos aglutinantes e eliminação de leptospira pela urina. Na leptospirose grave, as manifestações como meningite, miocardite, pneumonia, hepatite ou nefrite podem ocorrer; ou ainda, provocar quadros como a disfunção hepática (icterícia), falência renal e hemorragias (principalmente pulmonar), tríade que caracteriza a forma clínica chamada de Síndrome de Weil, que pode levar o indivíduo a falência múltipla dos órgãos acompanhada de morte (LEVETT, 2001; VINETZ, 2001).

Os animais domésticos e de criação mais acometidos são cães, bovinos e suínos e equinos. As manifestações da leptospirose canina são septicemia e comprometimento hepático e renal. Na pecuária, a doença é responsável por grandes perdas econômicas, uma vez que pode influenciar o potencial reprodutivo do rebanho. A leptospirose pode provocar a infertilidade, mastites, abortos, natimortalidade e déficit na produção de leite e de carne. A uveíte recidivante são ocorrências mais comuns em equinos (FAINE et al., 1999).

A realização de exames laboratoriais é de grande importância no diagnóstico da leptospirose, devido à semelhança dos sintomas aos de outras doenças, como febre amarela, dengue, malária, hepatite e gripe, e da polimorfia das manifestações clínicas (FAINE et al.,

1999; LEVETT, 2001, 2003). A confirmação da doença pode ser evidenciada pelo isolamento de leptospira, PCR ou detecção de anticorpos específicos. A Organização Mundial de Saúde recomenda o teste de soroaglutinação microscópica (SAM) para o diagnóstico da leptospirose humana e animal, essa técnica emprega suspensões de leptospiras vivas como antígeno. Após a incubação, verifica-se a aglutinação das leptospiras em microscópio de campo escuro. O SAM pode levar até quinze dias para confirmar o diagnóstico clínico da doença. Embora o ensaio seja um teste de referência, há dificuldades na interpretação dos resultados devido ao alto grau de reações cruzadas entre os diferentes sorovares. O diagnóstico errado pode levar a progressão da forma grave de doença que, geralmente, leva os acometidos ao óbito (LEVETT, 2001, 2003; WHO, 2003). O desenvolvimento de um método diagnóstico mais rápido e sensível é essencial. A detecção precoce da leptospirose aumenta a chance de um tratamento adequado e diminui os riscos.

O controle da leptospirose requer medidas difíceis de serem implementadas como a eliminação de roedores e a melhoria das condições de moradia da população. Em países em desenvolvimento, essas medidas não são praticadas eficientemente, o que tem contribuído para o aumento do número de casos de leptospirose, reforçando a necessidade de uma vacina eficiente contra a doença (FAINE et al., 1999).

As vacinas comerciais disponíveis até o momento consistem em preparações de culturas de leptospiras de diferentes sorovares de *L. interrogans* inativadas pela ação do calor e/ou formol (bacterinas). São amplamente usadas na pecuária e licenciadas para uso humano somente em Cuba, Rússia, China e Argentina. Todas apresentam baixa eficiência, pois promovem proteção usualmente contra os sorovares presentes na preparação e falham em induzir imunidade de longa duração, o que requer administração anual ou semestral (FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003). Além disso, contêm uma série de contaminantes oriundos do processo de obtenção, como componentes do meio e lipopolissacarídeos (LPS), que têm sido associados aos efeitos adversos observados (LEVETT, 2001).

Como alternativa, tem sido proposto o desenvolvimento de uma vacina multivalente com o emprego de proteínas de membrana de leptospiras, que além de estarem envolvidas na interação das bactérias com as células do hospedeiro, também são bastante conservadas entre as diferentes espécies e sorovares.

Recentemente, foram sequenciados oito genomas de leptospiras, sendo dois de *L. interrogans* sorovar Lai e Compenhageni (REN et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2004a,b), duas estirpes de *L. borgpetersenii* (L550 e JB197) sorovar Hardjo-bovis (BULACH et al., 2006), duas estirpes saprófita *L. Biflexa* (Paris e Ames) sorovar Patoc I (PICARDEAU et al.,

2008), e de duas estirpes de *L. licerasiae* sorovar Varillal (VAR010 e MMD0835) (RICALDI et al., 2012). As análises computacionais destas sequências têm contribuído para a identificação de genes que codificam proteínas possivelmente envolvidas na patogênese da doença, na virulência e na interação patógeno-hospedeiro e suas formas recombinantes têm sido avaliadas como candidatos vacinais em modelos animais (NASCIMENTO et al., 2004a, b).

Apesar de a leptospirose ter sido descoberta há mais de 100 anos e do grande avanço científico, na última década, com o advento dos sequenciamentos genômicos, os mecanismos de imunidade e patogencidade ainda não são completamente compreendidos, o que tem dificultado o desenvolvimento de novas estratégias de intervenção.

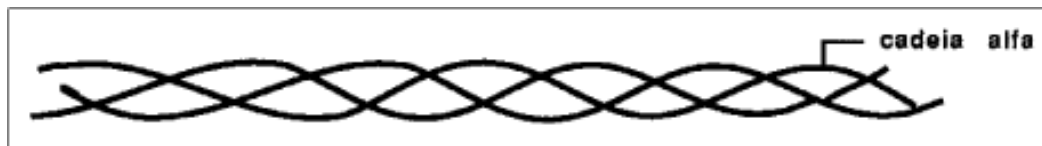
A progressão da infecção, após a entrada no hospedeiro, envolve a adesão das bactérias às células eucarióticas e às proteínas de matriz extracelular seguida pela invasão aos tecidos. Estudos recentes demonstraram que as leptospiros são capazes de se translocarem através das monocamadas celulares, o que poderia ser um mecanismo de evasão do sistema imune e também facilitaria a entrada e saída da corrente sanguínea para infectar órgãos-alvo. A presença de leptospiros no citoplasma de macrófagos, monócitos e células Vero foi observada *in vitro*. Apesar disso, não existem evidências que estas bactérias sejam capazes de se multiplicarem no interior das células hospedeiras, o que sugere que as leptospiros sejam bactérias invasivas extracelulares (MERIEN et al., 1997; BAROCHI et al., 2002). O mecanismo envolvido na invasão do patógeno através das barreiras extracelulares não está bem elucidado (MADATHIPARAMBIL et al., 2011). Enzimas capazes de degradar proteínas da matriz extracelular poderiam contribuir com a motilidade e quimiotaxia das bactérias durante a invasão.

Bactérias patogênicas sintetizam e secretam diferentes tipos de proteases, que atuam degradando colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas entre outras proteínas do hospedeiro. O colágeno é a proteína mais abundante nos mamíferos, compõe aproximadamente 30% do total de proteínas presentes no organismo. Podem ser encontrados em todo o corpo, mas, em particular, como fibras insolúveis da matriz extracelular de tecidos conectivos de quase todos os órgãos e atuando, principalmente, para dar estrutura e força aos tecidos. Portanto, qualquer processo que resulte na degradação ou diminuição da integridade desta molécula, estará propenso a apresentar implicações significantes para a saúde (HARRINGTON, 1996; WATANABE, 2004).

As longas moléculas de colágeno (aproximadamente 300 nm) compreendem três cadeias polipeptídicas (cadeias alfas) paralelas organizadas em forma de hélice. Cada cadeia é

uma hélice que torce em torno de um eixo comum formando uma longa tripla hélice (Figura 1). Os domínios centrais das triplas hélices apresentam repetições de uma sequência tripla de aminoácidos, formada por Gly-X-Y, onde Gly é glicina X e Y são, frequentemente, prolina e hidroxiprolina, respectivamente. A estabilidade da tripla hélice é produzida por pontes de hidrogênio e *cross-link* intra e extramolecular. A desnaturação da tripla hélice do colágeno leva a ruptura dessas ligações que resulta na produção de gelatina (RAMACHANDRAN, 1988; HARRINGTON, 1996).

Figura 1 – Molécula de colágeno: tripla hélice formada pelo entrelaçamento das três cadeias alfas



Fonte: Vargas, D.M.; Audí, L.; Carrascosa, A. (1997)

Existem, pelo menos, 19 tipos de colágenos e suas cadeias alfas são codificadas por genes distintos, os diferentes tipos de colágenos são designados por algarismos romanos. A diferença entre os tipos de colágeno está geralmente associada a tecidos específicos, e essa heterogeneidade pode refletir suas diferentes funções fisiológicas, específicas do local de cada tipo de colágeno. Por exemplo, os colágenos fibrilares clássicos são os tipos I, II, III, V, e IX, uma vez que são compostos por uma tripla hélice contínua com extremidades não helicais, enquanto que o colágeno tipo IV possui muitas regiões não helicais e sua montagem assegura a formação de tetrâmeros que favorecem a interação com domínios globulares para a formação de rede de colágeno. Além disso, a variação na estrutura molecular dos diferentes colágenos pode ter implicações na natureza das enzimas que são capazes de clivar cada tipo específico (VAN DER REST; GARRONE, 1991; HARRINGTON, 1996).

Devido à sua estrutura rígida, apenas um número limitado de proteases podem clivar a molécula de colágeno. Estas proteases são conhecidas como colagenases, pois clivam regiões helicais da molécula de colágeno sob condições fisiológicas de pH e temperatura. Há proteases colagenolíticas que são confundidas com colagenases, pois são capazes de degradar gelatina e regiões não helicais da molécula de colágeno. É muito difícil diferenciar as colagenases de outras proteases colagenolíticas, devido à diversidade estrutural do colágeno (HARRINGTON, 1996; WATANABE, 2004).

Os estudos com colagenases iniciaram no final do século passado com o reconhecimento de proteases clostridianas envolvidas no processo de putrefação de tecidos e, na sequência, o isolamento de uma enzima extracelular de *Clostridium histolyticum* capaz de

digerir tendões. Desde então, outras collagenases de bactérias e de mamíferos foram identificadas e caracterizadas, sendo apenas poucos estudos sobre proteases collagenolíticas bacterianas. Recentemente a produção de collagenase foi considerada restrita a poucas espécies bacterianas, entre elas as collagenases ColG e ColH, responsáveis pela necrose dos tecidos do hospedeiro do patógeno *C. histolyticum* (MATSUSHITA et al., 1994, 1998, 1999; HARRINGTON, 1996; WATANABE, 2004).

As collagenases do *C. histolyticum* pertencem à família das metaloproteases, que são proteases que possuem um ou dois íons de metal em seus centros de ligação, que corresponde ao motivo conservado HEXXH (FUKASAWA, 2011). O Zn^{2+} é íon mais comum, contudo podem ser encontrados em menor número no centro de ligação ao íon de metal de algumas metaloproteases os íons Mg^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} . O papel destes íons nas metaloproteases é de ativar uma molécula de água que atuará como um nucleófilo durante a catálise (WU; CHEN, 2011). Embora esse motivo seja bem conservado nessas enzimas, o terceiro ligante (o ácido glutâmico) está intimamente presente em poucas metaloendopeptidases bacterianas já relatadas. Contudo, alto grau de homologia na sequência adjacente ao motivo HEXXH tem sido notificado, em vários grupos de metaloproteases, incluindo as collagenases, as proteínas da família astacins e as metaloproteases presentes em veneno de cobras (JIANG; BOND, 1992).

Enzimas proteolíticas são classificadas de acordo com seu sítio catalítico, sendo cinco os tipos principais presentes em bactérias: metalo, serino, cisteino, treonino e aspartato-proteases, das quais as três primeiras são amplamente difundidas em bactérias e possuem funções críticas como a colonização, a evasão dos componentes do sistema imune do hospedeiro, a aquisição de nutrientes para desenvolvimento e proliferação, a facilidade na disseminação, os danos aos tecidos durante a infecção, a interrupção das vias de ativação de cascata e da rede de citocinas, a excisão de receptores de superfície e a inativação de inibidores de proteases de hospedeiros (SUPURAN; SCOZZAFAVA; CLARE, 2002; FUKASAWA, 2011).

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para avaliação das enzimas proteolíticas, a zimografia é um método funcional que permite a visualização do tamanho aproximado de enzimas com base na degradação de um substrato copolimerizado com géis de dodecil sulfato de sódio (SDS). Os substratos mais comuns utilizados nos estudos de proteases são: gelatina, caseína e colágeno. O resultado é visualizado após a coloração do gel, no qual sítios de proteólises se revelam em bandas brancas. A intensidade dessas bandas está relacionada com a quantidade de protease submetida ao procedimento (LEBER; BALKWILL, 1997).

Estudos mostraram que algumas enzimas proteolíticas, consideradas colagenases, não são capazes de hidrolizar a molécula nativa de colágeno, mas apresentam atividade contra qualquer colágeno não fibrilar ou peptídeos sintéticos análogos ao colágeno, como o PZ-PLGPA (phenylazobenzoyloxycarbonyl-L-leucylglycyl-L-prolyl-D-arginine) e o PZ-PLGPR (4-phenylazobenzoyloxycarbonyl). Tais substratos sintéticos possuem uma sequência específica da molécula do colágeno (-Gly-Pro-X) tal qual o substrato das colagenases de *Clostridium*. Colagenases bacterianas, em particular as metaloproteases, clivam esses substratos na ligação Leu-Gly, e, neste consenso, muitas colagenases bacterianas são consideradas Pz-peptidases. No entanto, é interessante notar que, uma vez que a maioria dos tipos de colágeno é não fibrilar ou contenha regiões não fibrilares, as enzimas que são capazes de degradar esses tipos de colágeno são tão relevante para a perda de integridade dos tecidos e progressão da doença como as colagenases que hidrolizam a molécula nativa fibrilar do colágeno (HARRINGTON, 1996; WATANABE, 2004).

O entendimento da atividade protelítica tem como pré-requisito o conhecimento dos inibidores de proteases para caracterização dessas enzimas. Qualquer composto que diminua a razão de hidrólise de um dado substrato pode ser um inibidor enzimático e são agrupados de acordo com sua origem, mecanismo de ação e similaridades estruturais. A inibição enzimática pode ser reversível, no qual o inibidor atua como um pseudosubstrato ou irreversível em que inibidores sítio-específicos modificam irreversivelmente um aminoácido do sítio ativo da enzima (TREMACOLDI, 2009). O quadro 1 apresenta a relação de alguns inibidores de proteases e a família na qual atuam.

Quadro 1 – Relação de inibidores e as famílias nas quais atuam

Inibidor	Família
AEBSF 4-(2-Aminoetil) cloridrato de fluoreto de benzenossulfonilo	Serinoproteases
Aprotinina	Serinoproteases
Bestatina	Leucinas aminopeptidaseses, aminopeptidases B e triaminopeptidases
E-64 Trans-epoxisuccinil-L-leucylamido-(4-guanidino) butano	Cisteinoproteases
EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético	Metaloproteases
EGTA Ácido etilenoglicol tetra-acético	Metaloproteases
Leupeptina	Serino e thiolproteases
Pepstatina A	Aspárticoproteases
PMSF Fenilmetilsulfonil fluoreto	Serinoproteases
Fenantrolina	Metaloproteases

Recentemente, um estudo por zimografia, utilizando como substrato gelatina e caseína e diferentes inibidores de proteases mostrou haver uma variedade de enzimas proteolíticas em *Leptospira* spp. As principais atividades gelatinolíticas de lisados bacterianos foram observadas em 12 bandas de peso molecular entre 32 e 240 kDa. Dentre essas, ressaltam-se quatro principais bandas (46, 48, 66 e 84 kDa) de alta atividade em *Leptospira* spp. Os estudos com inibidores mostraram que as proteases de *Lepstospira* spp incluem, metalo, serino e cisteino proteases. (LEBER; BALKWILL, 1997; MADATHIPARAMBIL et al., 2010). Análises dos genomas disponíveis indicaram a presença de vários genes que codificam prováveis proteases, entre elas uma provável colagenase (LIC12760) escolhida para este estudo, corroborando os resultados obtidos pela zimografia (REN et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2004a,b; MADATHIPARAMBIL et al., 2010).

A comprovação experimental da existência e a caracterização funcional da provável colagenase contribuirão para o entendimento da patogenia da leptospira. Neste sentido, esse trabalho propôs a clonagem, expressão e caracterização funcional de uma provável colagenase de *L.interrogans* sorovar Copenhageni.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O projeto propôs a clonagem, expressão e caracterização funcional de uma provável collagenase de *L.interrogans* sorovar Copenhageni. Esta proteína foi selecionada utilizando os dados disponíveis no genoma e ferramentas de bioinformática.

2.2 ETAPAS DE TRABALHO

- 1- Análise *in silico* e estratégias de clonagem.
- 2- Obtenção dos insertos correspondentes à regiões codificantes dos domínios de collagenase.
- 3- Clonagem dos insertos em vetor pAE de expressão em *Escherichia coli*.
- 4- Indução da expressão das proteínas recombinantes.
- 5- Purificação das proteínas recombinantes utilizando cromatografia de afinidade a metal.
- 6- Obtenção de soros hiperimunes contra as proteínas recombinantes purificadas.
- 7- Avaliação da imunogenicidade dos soros obtidos por ELISA e *Western blotting* contra extratos de *Leptospira interrogans* de diferentes sorovares.
- 8- Avaliação da atividade proteolítica das proteínas recombinantes purificadas.
- 9- Caracterização do efeito hemorrágico das proteínas recombinantes em camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTIRPES BACTERIANAS

A espécie saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc e as espécies patogênicas de *Leptospira* spp.: *L. noguchii* sorovar Panamá, *L. borgpetersenni* sorovar Javanica, *L. borgpetersenni* sorovar Tarassovi, *L. interrogans* sorovar Pomona, *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 10A e *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 foram fornecidas pelo Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos (FMVZ – USP) e cultivadas sob condições aeróbicas em meio líquido EMJH (Difco-EUA). As culturas foram mantidas a uma temperatura de 29 °C, sem agitação. O crescimento bacteriano foi monitorado em microscópio de campo escuro e a contagem celular foi realizada em câmara de *Petroff-Hausser*.

A virulência da espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 foi mantida através da passagem em hamsters experimentalmente infectados segundo protocolo descrito em Faine et al. (1999). Animais recém-desmamados foram inoculados intraperitonealmente com 500 µl (10^8 células/mL) de cultura e monitorados diariamente para acompanhamento de sintomas clínicos de leptospirose como, perda de peso, anorexia e imobilidade. Após a morte dos animais, que ocorreu entre 5-10 dias, as bactérias foram recuperadas a partir do macerado do fígado ou rim e cultivadas em meio EMJH modificado ou meio semissólido de *Fletcher* (Difco-EUA) e mantidas no máximo até terceira passagem *in vitro*. Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Zoonoses Bacterianas (FMVZ – USP) em colaboração com a equipe coordenada pelo Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos.

A espécie *E. coli* BL21-SI (Novagen) foi utilizada para expressão das proteínas recombinantes, uma vez que possuem o gene da T7 RNA polimerase integrado ao genoma, sob o controle do promotor *proU*, induzível por NaCl. Esta estirpe bacteriana foi cultivada em meio LB-ON (1% bacto-triptona e 0,5% extrato de levedo) a 30 °C, com agitação. A linhagem *E. coli* DH5α, utilizada na clonagem, foi cultivada em meio LB (1% bacto-triptona, 0,5% extrato de levedo, 1% NaCl), a 30 °C, com agitação.

3.2 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.2.1 Análise *in silico* e estratégia de clonagem

A proteína colagenase A (ColA) foi selecionada para este trabalho (Quadro 2), através de análise *in silico*, utilizando os os dados disponíveis no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 (<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/leptospira/>) e as ferramentas de bioinformática descritas a seguir:

- ✓ CDART (*Conserved Domain Architecture Retrieval Tool*) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>; que permite buscas por similaridade baseadas na arquitetura dos domínios de proteínas depositados no banco de dados do NCBI.
- ✓ PSORTb versão 3.0.2 (*Prediction of Protein Sorting Signals and Localization Sites in Amino acid Sequences*), disponível em <http://www.psорт.org/psортb/>, que possibilita a predição da localização celular da proteína.
- ✓ BLASTp (*Basic Local alignment Search Tool protein*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que foi usado para identificar sequências proteicas similares.
- ✓ SpLip (*Prediction of Spirochaetal Lipoproteins*), banco de dados disponível em <http://mic.sgmjournals.org/cgi/content/full/152/1/113/DC1/7>, com as prováveis lipoproteínas codificadas pelos genomas das espiroquetas disponíveis até o momento, foi utilizado para identificar a presença de lipobox na proteína estudada.

Quadro 2 - Nomenclatura e massa molecular da proteína nativa e acesso no GenBank

<i>Nomenclatura do Genoma</i>	<i>Massa molecular da proteína nativa (kDa)</i>	<i>GenBank</i>
LIC12760	101,60	YP_002680

Para caracterizar os domínios catalíticos da colagenase em *E.coli*, foram clonadas as sequências correspondentes às regiões codificantes dos dois domínios de colagenase juntos e separados. As regiões codificantes dos dois domínios catalíticos de colagenase (*Full*), do domínio de colagenase amino-terminal (D1) e do domínio de colagenase carboxi-terminal (D2) foram amplificadas por reação de PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 e oligonucleotídeos complementares.

O DNA genômico desta estirpe L1-130 foi isolado a partir de 50 mL de cultura com sete dias de incubação a 29 °C. As células bacterianas foram coletadas por centrifugação a 2.200x g, por 15 minutos, a temperatura ambiente e o sedimento obtido foi ressuspensionado em 50 mL de tampão PBS. Posteriormente, foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores. As células foram coletadas e ressuspensionadas em 180 µL de solução PureLink *Genomic Digestion Buffer* (Invitrogen - USA). A extração do DNA foi realizada utilizando o PureLink *Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen- USA) seguindo as instruções do fabricante.

Os fragmentos amplificados por PCR foram isolados do gel de agarose (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e purificados utilizando-se o *kit PureLink – gel extraction* (Invitrogen). Os produtos de PCR purificados foram clonados no vetor pGEM-T (Promega). Este vetor foi desenvolvido para clonar produtos de PCR e dessa maneira otimizar as reações de digestão com enzimas de restrição. As misturas de ligação dos produtos de PCR e pGEM-T foram usadas na transformação da linhagem *E.coli* DH5α por CaCl₂ (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Esta linhagem bacteriana competente foi obtida segundo o protocolo descrito em Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio líquido LB e a cultura foi mantida durante a noite, a 37 °C, com agitação de 250 rpm. No dia seguinte, 2 mL da cultura foram inoculados em 100 mL de meio líquido LB pré-aquecido, mantendo as mesmas condições de crescimento anterior até atingir a densidade ótica a 600 nm de 0,6 a 0,7. Ao final do período de incubação, a cultura foi resfriada em banho de gelo e 1 mL de solução 1 M MgCl₂ foi adicionado ao cultivo. Após 15 minutos, a cultura foi centrifugada a 1.400x g por 15 minutos a 4 °C. O sedimento bacteriano foi ressuspensionado com 20 mL de solução RFI (100 mM KCl; 50 mM MnCl₄; 30 mM Acetato de Potássio; 10 mM CaCl₂ e 15% Glicerol) e mantida em repouso por 15 minutos no gelo. A cultura foi centrifugada a 1.400x g por 15 minutos a 4 °C e o sedimento foi ressuspensionado em 2 mL de solução RFII (10 mM KCl; 75 mM CaCl₂; 10 mM

Na-MOPS e 15% Glicerol). A suspensão foi armazenada a -80 °C, em alíquotas de 50 µl até o momento do uso.

Para a transformação, as bactérias competentes foram mantidas em banho de gelo por aproximadamente 15 minutos. O DNA foi adicionado em cada alíquota de bactéria competente descongelada e o tubo contendo a mistura foi mantido em banho de gelo por 30 minutos. Posteriormente, foi realizado um choque térmico por 2 minutos a 42 °C e os tubos foram colocados novamente no banho de gelo por 5 minutos. À mistura, foram adicionados 350 µl de meio LB previamente aquecido e a incubação foi realizada a 37 °C com agitação por 90 minutos. A cultura foi plaqueada em meio LB-ágar (1% bacto-triptona, 0,5% extrato de levedo, 1% NaCl, 1,5% bacto-ágar) contendo ampicilina (100 µg/µl) e incubada a 37 °C, por 12 a 18 horas. As colônias recombinantes foram selecionadas em meio contendo ampicilina. Posteriormente, para confirmar a presença dos insertos, foram feitas preparações plasmidiais utilizando Kit PureLink – Plasmid miniprep (Invitrogen). O DNA obtido foi digerido com enzimas de restrição apropriadas e analisado em géis de agarose. Os clones positivos foram sequenciados pelo método da terminação da cadeia, utilizando sequenciador automático 3100 Genetic Analyzer da Applied Biosystems (Hitachi) e os oligonucleotídeos específicos M13 *forward* e *reverse*.

Os insertos clonados no pGEM-T foram transferidos para o vetor de expressão pAE a partir de digestões com as enzimas de restrição específicas. Os fragmentos de interesse foram isolados do gel de agarose (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), purificados utilizando-se o *kit* PureLink – gel extraction (Invitrogen) e subclonados no vetor pAE, previamente digerido com as mesmas enzimas. O vetor pAE foi desenvolvido para expressão de proteínas heterólogas em fusão com uma cauda de seis resíduos de histidina na porção N-terminal sobre o controle do promotor de T7 (ABREU et al., 2004; RAMOS et al., 2004).

As misturas de ligação dos fragmentos correspondentes aos genes e o pAE digeridos foram usados na transformação da linhagem *E.coli* DH5α por CaCl₂ (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As colônias recombinantes foram selecionadas em meio contendo ampicilina. Para verificar a presença de inserto, serão feitas preparações plasmidiais das colônias obtidas da transformação utilizando-se o *kit* PureLink – Plasmid miniprep (Invitrogen). O DNA obtido foi digerido com enzimas de restrição apropriadas e analisado em géis de agarose. Os clones positivos foram sequenciados utilizando-se os oligonucleotídeos sintéticos T7 *forward* e pAE *reverse*.

Os clones que apresentaram bandas com peso molecular esperado e sequências corretas foram selecionados para cultivo e indução em maior escala para estudo da solubilidade das proteínas recombinantes.

3.2.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Para verificar a expressão dos fragmentos recombinantes, a linhagem *E.coli* BL21-SI competente foi transformada com as construções pAE-Full, pAE-D1 e pAE-D2. Colônias isoladas foram inoculadas em meio LBON suplementado com ampicilina (100 µg/mL). A cultura foi incubada a 30 °C por 18 horas, sob agitação de 250 rpm. O pré-inóculo foi transferido para meio fresco contendo ampicilina, utilizando-se uma diluição 1:20, a cultura foi mantida a 30°C sob agitação até DO 600nm = 0,6 a 0.8. Neste momento, adicionou-se 300 mM de NaCl, mantendo-se a incubação por mais 3 horas. Após a indução, a cultura bacteriana foi centrifugada (2.000x g por 15 minutos a 4°C), as células foram coletadas e armazenadas a -80°C até o momento do uso. As amostras foram analisadas em gel de SDS-PAGE segundo protocolos descritos por Laemmli (1970) e Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

O sedimento bacteriano foi ressuscitado em 5 volumes (p/v) de tampão PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄ e 1,5 mM KH₂PO₄). A seguir, a suspensão bacteriana foi lisada através da passagem pelo *French Pressure Cell Press* (*SLM Aminco*).

A suspensão resultante da lise foi centrifugada a 12.800x g por 15 minutos, a 4 °C. A fração solúvel foi coletada e mantida a 4 °C até o momento da purificação. O sedimento (corpúsculos de inclusão - fração insolúvel) foi lavado duas vezes com tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0). Amostras da fração solúvel, fração insolúvel e das lavagens foram analisadas em gel SDS-PAGE com 12% de acrilamida.

As proteínas recombinantes foram purificados em cromatografia de afinidade metálica a partir da fração insolúvel, utilizando resina de sepharose (“*Fast Flow chelating Sepharose*” - GE Healthcare). Para tanto, o sedimento de corpúsculos de inclusão lavado e ressuscitado em 10 volumes (p/v) de tampão de solubilização (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol, 0,1% de Triton (v/v), 8 M uréia e pH 7,9) e mantido a temperatura ambiente por 2 horas com agitação. Posteriormente, o solubilizado foi diluído lentamente em 100X em 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol e pH 7,9. Esta solução foi adsorvida

(fluxo 1 ml/min) à coluna de afinidade a metal, previamente carregada com 5 volumes de 100 mM NiSO₄ e equilibrada com 3 volumes de tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol e pH 7,9). Para eliminação das proteínas contaminantes, a resina foi lavada com 10 volumes do tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol e pH 8,0) e 20 volumes do tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 60 mM de imidazol e pH 8,0). A proteína recombinante foi eluída com 6 volumes do tampão de eluição (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 1 M imidazol e pH 8,0). A proteína purificada foi dialisada progressivamente contra: (i) tampão 1 (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazol, 0,1% glicina, pH 8,0); (ii) tampão 2 (10 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,1% glicina e pH 8,0; (iii) PBS com 0,1% glicina e pH 7,6. Frações de todas as etapas da purificação coletadas e analisadas em gel SDS-PAGE com 12% acrilamida.

As frações de todas as etapas da purificação foram coletadas e analisadas em gel SDS-PAGE. A concentração da proteína recombinante purificada foi calculada pela leitura fluorimétrica, utilizando o fluorímetro Qubit[®] 2.0, este equipamento permite a quantificação de DNA, RNA e proteínas utilizando corantes fluorescentes específicos para cada tipo de biomolécula, mesmo em baixas concentrações, conferirem uma alta especificidade e sensibilidade.

Após a purificação das proteínas recombinantes foi realizado *Western-Blotting* (BURNETTE, 1981) utilizando o anticorpo monoclonal anti-histidina (GE Healthcare) para verificar a eficácia do processo de obtenção das proteínas recombinantes. E, para tanto, as proteínas recombinantes purificadas foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose (0,22 µm, BA-S 83, Schleicher & Schuell) em sistema semisseco (Bio-Rad). A reação com o primeiro anticorpo foi feita com anti-histidina (diluição de 1:3000) seguido de incubação com o segundo anticorpo anti-mouse conjugado com peroxidase (Sigma) (diluição 1:5000). A detecção foi realizada através da utilização do “*kit*” ECL (Armeshan), neste caso, a membrana foi exposta a filme de raios-X (Kodak) por tempos curtos (1 a 5 minutos) e o filme revelado.

3.3 ELETROFORESE EM GEL SDS-PAGE

As eletroforeses foram feitas segundo protocolos descritos por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Os géis utilizados possuíam 1,0 mm de espessura, 5% de bisacrilamida/acrilamida no gel de empilhamento e 10% ou 12% de bisacrilamida/acrilamida

no gel de separação (a partir de uma solução de 29% Acrilamida e 1% Bisacrilamida). As eletroforeses foram feitas a 8 V/ cm de gel de empilhamento e 15 V/cm de gel de separação, a temperatura ambiente.

Posteriormente, os géis foram posteriormente corados com “Coomassie Blue Brilliant R-250” (USB, Cleveland, OH, EUA) em 50% etanol e 10% ácido acético em água por 1-2 horas a temperatura ambiente e descorados com solução de 30% etanol e 10% ácido acético em água. Para secar, foram envoltos em papel celofane.

3.4 OBTENÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL EM COELHOS E TESTES DE IMUNOGENICIDADE

Para a produção dos soros hiperimunes contra as proteínas recombinantes D1, D2 e *Full*, três coelhos foram imunizados separadamente por via intramuscular com 200µg de proteína recombinante purificada e hidróxido de alumínio como adjuvante, com dois reforços em intervalo de aproximadamente 15 dias. Os animais sofreram a primeira sangria auricular antes das imunizações como controle do soro (pré-imune) e após as imunizações uma sangria total por punção cardíaca, após pré-anestesia com xilazina (3mg/kg) e anestesia com Ketamina 50mg/kg. Protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan - CEUIB, com o número 849/11. O sangue coletado foi mantido a 37 °C por 30 minutos e posteriormente, o coágulo foi deslocado da parede do tubo com auxílio de um palito de madeira e centrifugado a 800 g por 15 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante coletado foi armazenado a – 20 °C.

A titulação dos soros obtidos foi feita por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) segundo método descrito em Sato et al. (1983). Para a adsorção dos antígenos, placas de micro-diluição foram expostas a uma solução contendo a proteína recombinante purificada. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 10 % Leite molico desnatado. As placas foram incubadas com diluições seriadas dos soros dos animais hiperimunizados, posteriormente com o segundo anticorpo conjugado com peroxidase. O reconhecimento foi realizado através de reação com o substrato o-fenilenodiamina na presença de traços de H₂O₂. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ e a intensidade da reação determinou-se pela leitura a 492nm (Labsystems iEMS).

Os títulos dos soros obtidos foram utilizados como referência na diluição dos soros hiperimunes em experimentos de Western-Blotting (BURNETTE, 1981). E para tanto, as proteínas recombinantes purificadas ou extrato total de *L. interrogans* de diferentes sorovares e da estirpe não patogênica, *L. biflexa* sorovar Patoc foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose (0,22 µm, BA-S 83, Schleicher & Schuell) em sistema semisseco (Pharmacia®). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S e fotografada para monitoração da transferência. A reação com o primeiro anticorpo foi feita com soro policlonal antiproteínas recombinantes (diluição 1:500) seguido de incubação com o segundo anticorpo conjugado com peroxidase (diluição 1:5000). A detecção foi realizada através da utilização do “kit” ECL (Amersham), neste caso, a membrana foi exposta a filme de raios-X (Kodak) por tempos curtos (1 a 15 minutos) e o filme revelado (BURNETTE, 1981).

3.5 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

3.5.1 Zimografia

A atividade enzimática das proteínas recombinantes purificadas foi avaliada através de zimografia em gel de poliacrilamida (10%) contendo gelatina (1 mg/mL). Após a eletroforese, o SDS foi removido do gel por uma lavagem de 30 minutos, utilizando-se solução de triton X-100 2,5%. Posteriormente, o gel foi colocado no tampão contendo 0,02% de triton X-100, 10 mM de CaCl₂, 1µM de ZnSO₄ e 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e incubado a 37°C durante a noite com agitação suave. O gel foi corado com Coomassie R250 0,25%, etanol 45% e ácido acético glacial 10% por 2 horas e tratado com a solução descorante contendo etanol 45% e ácido acético glacial 10% até o clareamento das bandas. A coloração com Coomassie permitiu a identificação de bandas de atividade proteolítica, detectadas como bandas claras contra um fundo azul.

3.5.2 Pz-peptidase

As proteínas recombinantes purificadas foram avaliadas quanto a capacidade de hidrolisar o peptídeo de colágeno utilizando o substrato sintético carbobenzoxi-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala-OH (*Collagenase Substrate Kit*, Fluka). Este substrato (componente A) ao ser hidrolisado pela enzima libera carbobenzoxi-Gly-Pro-Gly e Gly-Pro-Ala-OH (componente B), este último reage com ninhidrina e pode ser quantificado pela leitura espectrofotométrica a $A_{565\text{nm}}$. A reação foi realizada em 0,1 M tampão citrato pH 6,3; por 5 minutos a 37°C; num volume final de 600 μl , correspondentes a 100 μl de cada proteína recombinante (5 μg de cada proteína) e 500 μl do substrato (concentração de 240 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Como controle positivo, foram utilizados 100 μl de colagenase do *Clostridium histoliticum* tipo IA (Sigma) (5 μg de proteína) e 500 μl do substrato. Esta enzima reconhece a sequência peptídica –R-Pro-X-Gly-Pro-R- e cliva entre o aminoácido X e a glicina. Como padrão, foram utilizados 600 μl do componente B (Gly-Pro-Ala-OH) na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. E, como branco, foram utilizados 500 μl do substrato (concentração de 240 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e 100 μl de 0,1 M tampão citrato, pH 6,3. Após a incubação, foram adicionados 600 μl de 20 mg/ml ninhidrina e 30 μl de 1,6% solução de cloreto de Tin(II) a cada 150 μl de reação. Os tubos foram misturados e mantidos por 15 minutos a 100 °C, posteriormente, resfriados em banho de água. Aos tubos resfriados, foi adicionado 1 ml de 50% propanol a cada 200 μl de reação da etapa anterior. A leitura espectrofotométrica foi feita a $A_{565\text{nm}}$, utilizando o aparelho Ultrospec modelo 2100pro (Amersham Biosciences). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que produz a liberação de 1 μmol de Gly-Pro-Ala-OH (componente B), em um minuto de reação a pH 6,3 e 37°C

3.6 ATIVIDADE HEMORRÁGICA

A atividade hemorrágica foi determinada utilizando o método descrito por Nakai et al. (1984) modificado, injetando-se pela via intradérmica, na pele ventral dos camundongos suíços, as proteínas recombinantes diluídas em PBS em um volume final de 200 μL . Doze horas após a injeção, os animais foram sacrificados por inalação de gás carbônico e a pele

retirada, estirada e os locais de injeção foram analisados macroscopicamente. Os protocolos para esta etapa foram aprovados pelas Comissões de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan – CEUIB e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP, com os números 1089/13 e 2383/2011, respectivamente. Como controle positivo foi utilizado o veneno bruto de *Bothrops jararaca* (gentilmente cedido pela Dra. Anita Tanaka Azevedo do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan) e como controle negativo PBS. As quantidades utilizadas de veneno e das proteínas recombinantes estão descritas no item resultados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *O gene LIC12760 codifica uma provável lipoproteína de localização extracelular, com dois domínios de collagenase (D1 e D2), sendo que o domínio D2 possui ainda uma sequência consenso de ligação ao zinco, característico de metaloproteases:*

A análise *in silico*, utilizando os dados genômicos da *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130, permitiu a identificação do gene LIC12760, que codifica uma sequência polipeptídica de 101,60 kDa. Esta proteína apresenta um peptídeo sinal característico de lipoproteínas de espiroquetas, constituído por uma região amino-terminal (região N) que se estende da metionina inicial até o último resíduo carregado; seguida por uma região hidrófoba (região H), que contém pelo menos 6 resíduos e por último, a região carboxi-terminal (região C) ou lipobox, composta por pelo menos 4 resíduos. Resíduos carregados, como Lys, Arg, Asp, Glu e His, não ocorrem nas regiões C e H. O lipobox de espiroquetas contém pelo menos um resíduo de Ser, Asn, Ala, Gly, Cys, Thr ou Gln na posição -1 e Leu, Phe, Val, Ile ou Tyr nas posições -3 ou -4. Assim como, um resíduo de cisteína é sempre encontrado na posição +1, pois o processamento lipídico das lipoproteínas bacterianas ocorre neste aminoácido. Neste processo, as lipoproteínas são clivadas por uma peptidase sinal (Lsp) e lipidadas por um processo que ocorre em três etapas. Inicialmente, a prolipoproteína diacilgliceril transferase transfere um grupo diacilgliceril (com dois ácidos graxos) de um fosfatidilglicerol para a cisteína na posição +1. Posteriormente, a Lsp remove o peptídeo sinal, tornando a cisteína o aminoácido amino-terminal. Finalmente, o terceiro ácido graxo é transferido de um fosfolípido da membrana para o átomo de nitrogênio da cisteína por uma apolipoproteína transacilase. Depois do processamento, a lipoproteína terá três moléculas de ácidos graxos ligados ao resíduo de cisteína (HANTLKE; BRAUN, 1973; SANKARAM; WU, 1993; WU, 1996; HAAKE, 2000).

Na figura 2, é possível observar que o peptídeo sinal codificado pelo gene LIC12760 apresenta as regiões descritas para as lipoproteínas de espiroquetas, demonstrando que, esta proteína provavelmente, é uma lipoproteína.

Figura 2 – Peptídeo sinal da proteína codificada pelo gene LIC12760 de *L.interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130



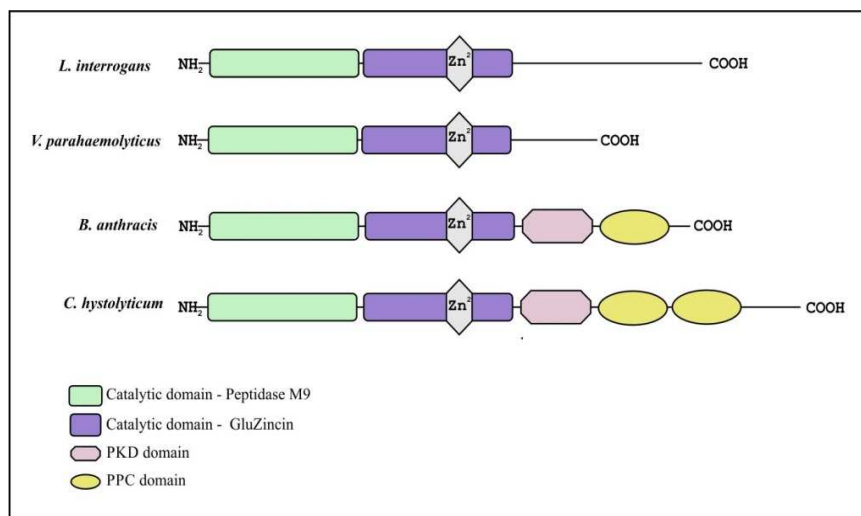
Para determinar a localização celular da proteína codificada pelo gene LIC12760, o programa PSORTB 3.02 foi empregado. Nesta versão, a predição consiste de uma análise múltipla que leva em conta várias características que influenciam na sublocalização celular, entre elas a presença de peptídeo sinal e de domínios conhecidos em proteínas já caracterizadas e (YU et al., 2010). Como resultado desta análise, a proteína foi considerada extracelular com escore máximo (10,0), principalmente porque apresentou alta similaridade com uma colagenase extracelular de *Vibrio anginolyticus*, já caracterizada experimentalmente (TAKEUCHI et al., 1992).

O processamento das lipoproteínas bacterianas ocorre no espaço periplasmático, depois da translocação da proteína através da membrana citoplasmática, pela maquinaria de secreção Sec. Posteriormente, as proteínas lipidadas associam-se com as membranas da bactéria através de interações hidrofóbicas entre a porção lipídica e a membrana, podendo estar localizadas na face periplasmática da membrana citoplasmática, no folheto interno da membrana externa ou no folheto externo da membrana externa. Portanto, não é esperado que lipoproteínas fossem extracelulares (YAMAGUCHI et al., 1988; SEYDEL; GOUNON; PUGSLEY, 1999; SETUBAL, 2006). Entretanto, os fatores que determinam esta localização não são bem entendidos. Algumas lipoproteínas de *Leptospira* spp. já foram encontradas no meio extracelular, como LipL32 (BRANGER et al., 2005) e a lipoproteína com domínio IgG-like (LigA) (MATSUNAGA et al., 2007). Tem sido discutido que as lipoproteínas são provavelmente liberadas para fora da célula por “shaving” proteolítico depois do processamento (ANTELMANN et al., 2001). Eymann et al. (1996) identificaram várias lipoproteínas com massas moleculares menores no secretoma de *Bacillus subtilis*, demonstrando a presença de mecanismos de secreção destas proteínas. Recentemente, Kassegne et al. (2014) identificaram uma proteína de *L.interrogans* sorovar Lai codificada pelo gene LA0872 que é idêntica a proteína codificada pelo gene LIC12760. E, comprovaram a secreção desta proteína para o meio extracelular durante a co-incubação das leptospiras com células HUVEC (human umbilical vein endotelial cell) e HEK293 (human renal tubular epithelial cell).

O programa CDART permitiu a análise por similaridade baseada na arquitetura dos domínios de proteínas depositados no banco de dados disponíveis no NCBI e confirmou os resultados obtidos pelo PSORTB. A figura 3 apresenta uma representação esquemática da similaridade da arquitetura dos domínios da colagenase de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 com as colagenases mais estudadas de outras espécies bacterianas. É possível observar, a presença de um domínio da superfamília de peptidase M9 encontrado na região amino-terminal de colagenases bacterianas. Normalmente, estas colagenases são, também, metaloproteases, pois possuem o domínio de ligação ao zinco (HEXXH) no seu sítio ativo. Como no caso da proteína codificada pelo gene LIC12760, onde o motivo de ligação ao zinco está presente no segundo domínio catalítico. As proteases que possuem este domínio pertencem a uma superfamília denominada GluZincin, que inclui várias metalopeptidases extracelulares, como a termolisina, bacilolisina, e a fungalisina, entre outras. Nestas peptidases, a ligação ao zinco é coordenada por três aminoácidos e uma molécula de água, que formam um nucleófilo na ativação durante a catálise (GEER et al., 2002).

Dessa forma, o gene LIC12760 codifica uma provável colagenase com dois domínios catalíticos, sendo que o segundo domínio possui ainda uma sequência consenso de ligação ao zinco, característico de metaloproteases. Por ser a primeira colagenase de *Leptospira* spp. descrita, foi denominada ColA.

Figura 3 – Representação esquemática da arquitetura dos domínios de colagenase *L. interrogans* sorovar Copenhageni (no presente estudo, ColA), *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus anthracis* e *Clostridium histolyticum*



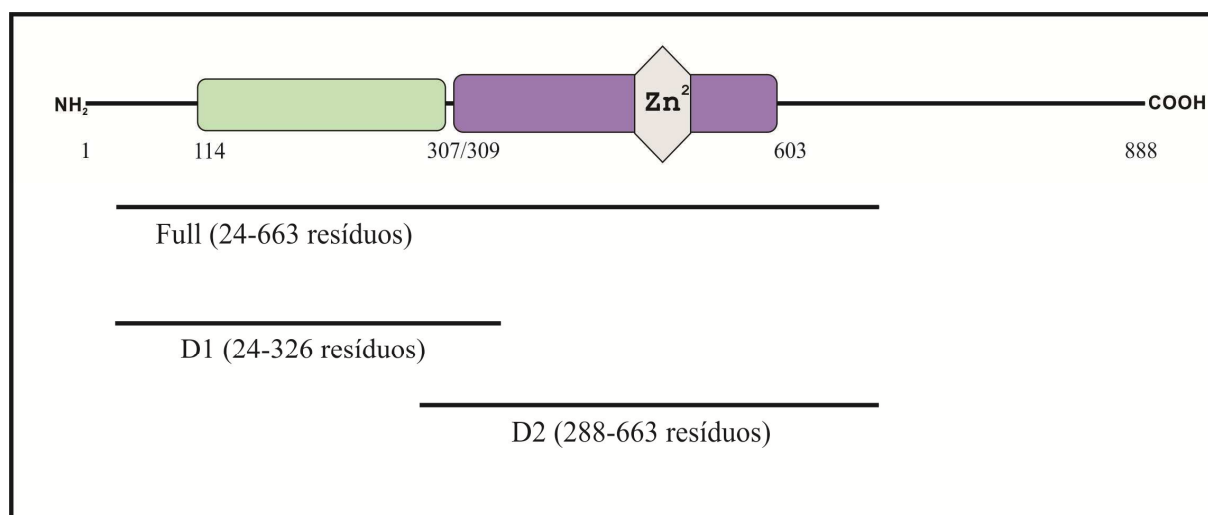
PKD, domínio de doença renal policística; PPC, domínio de pré-peptidase C-terminal.

4.2 Três fragmentos recombinantes da ColA foram produzidos, que correspondem aos dois domínios catalíticos de collagenase (*Full*), ao domínio de collagenase amino-terminal (*D1*) e ao domínio de collagenase carboxi-terminal (*D2*). As proteínas recombinantes (*Full*, *D1* e *D2*) foram expressas na fração insolúvel e purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel

Para caracterizar os domínios catalíticos da ColA, as sequências correspondentes às regiões codificantes dos dois domínios de collagenase juntos e separados foram clonadas em vetor de expressão bacteriano utilizando *E.coli* (Figura 4). A produção heteróloga de proteínas em *E.coli* com peptídeo sinal nativo, geralmente, ocasiona dificuldades de expressão. Isto ocorre porque as sequências não são as mesmas e a bactéria pode não reconhecê-las. Para evitar este problema, a região que codifica o peptídeo sinal (aminoácidos 1 ao 23) não foi incluída nas proteínas recombinantes *Full* e *D1*. Outra característica importante é que a *E.coli*, geralmente é incapaz de formar ligações dissulfeto corretamente, tornando as proteínas recombinantes que possuem muitas cisteínas, inativas. Dessa forma, a porção carboxi-terminal da ColA (aminoácidos 664 ao 888), com oito cisteínas, foi eliminada na estratégia de clonagem.

As regiões codificantes dos dois domínios catalíticos de collagenase (*Full*), do domínio de collagenase amino-terminal (*D1*) e do domínio de collagenase (*D2*) foram amplificadas por reação de PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 e oligonucleotídeos complementares descritos no quadro 3.

Figura 4 - Representação esquemática da ColA e os fragmentos da proteína recombinante: domínio 1 (*D1*), domínio 2 (*D2*) e ambos os domínios (*Full*)



Quadro 3 - Oligonucleotídeos usados nas clonagens

<i>Nomenclatura do fragmento</i>	<i>Oligonucleotídeos usados nas clonagens</i>	<i>Tamanho dos fragmentos obtidos por PCR (pb)</i>
<i>Full</i>	F: <u>CGCTCGAGA</u> AATAGCCAAAATAATGGC R: CGA <u>AAGCTT</u> CTAAGCAGGCGTAGATGG	1939
D1	F: <u>CGCTCGAGA</u> AATAGCCAAAATAATGGC R: CGA <u>AAGCTT</u> CTACCAGACTTGAGAATCTG	928
D2	F: <u>CGCTCGAGCGT</u> CATATCCATTC R: CGA <u>AAGCTT</u> CTAAGCAGGCGTAGATGG	1142

As regiões sublinhadas correspondem aos sítios de restrição *XhoI* e *HindIII* utilizados nas clonagens.

Os fragmentos amplificados por reação de PCR apresentaram bandas de tamanho esperado como pode ser observado na figura 5A e no quadro 3. Estes fragmentos foram isolados do gel de agarose e purificados e os produtos de PCR purificados foram ligados ao vetor pGEM-T Easy. A seleção dos clones positivos de cada clonagem foi feita em placas contendo IPTG, X-Gal e ampicilina e também através de análise de restrição. A dupla digestão com as enzimas *XhoI* e *HindIII* originou dois fragmentos de tamanho esperado para cada reação; um correspondente ao inserto e o outro ao vetor (resultados não mostrados).

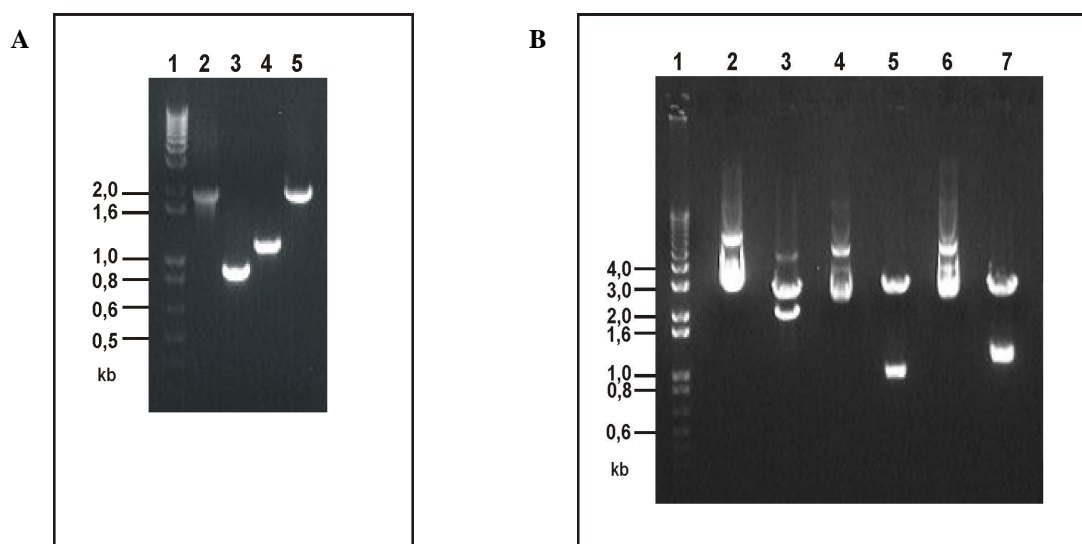
Todas as construções em pGEMT positivas foram sequenciadas completamente utilizando-se os oligonucleotídeos M13-*forward*, M13-*reverse* e internos (*Full597* e *Full1383*) (quadro 4). A análise dos cromatogramas mostrou que as sequências dos genes são as mesmas obtidas no projeto genoma (resultados não mostrados) (NASCIMENTO et al., 2004a).

Cada construção em pGEMT foi usada na preparação do inserto correspondente ao fragmento a ser subclonado no vetor de expressão pAE, através da digestão com as enzimas *XhoI* e *HindIII*. Cada fragmento foi purificado e ligado ao vetor pAE, previamente digerido com as mesmas enzimas. A seleção dos clones positivos de cada clonagem foi feita em placas contendo ampicilina e também através de análise de restrição. A dupla digestão com as enzimas *XhoI* e *HindIII* originou dois fragmentos de tamanho esperado para cada reação; um correspondente ao inserto e o outro ao vetor. Na figura 5B é possível observar os fragmentos de 1.935, 924 e 1.140 pb dos insertos de *Full*, D1 e D2, respectivamente e de 3.394 pb correspondente ao vetor pAE (Figura 5B). Todas as construções em pAE foram sequenciadas completamente utilizando os oligonucleotídeos sintéticos T7-*forward*, T7-*reverse* e internos (*Full597* e *Full1383*) (quadro 4). A análise dos cromatogramas mostrou que estas construções estão na orientação e quadro de leitura corretos (resultados não mostrados).

Quadro 4 - Oligonucleotídeos usados nos sequenciamentos

M13-forward:	GTAAAACGACGGCCAG
M13-reverse:	CAGGAAACAGCTATGAC
T7-forward	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 reverse:	CAGCAGCCAACTCAGTTCCT
FullF597:	GCAAGTAGTGCACACTTC
FullR1383:	CGTTCTATGTAGATCCCACC

Figura 5 - A - Análise dos produtos obtidos por PCR a partir do DNA genômico de *Leptospira interrogans* em gel de agarose (1 %). B - Digestão com as enzimas *XhoI* e *HindIII* dos clones positivos da construção pAE-Full, pAE-D1 e pAE-D2 em Gel de agarose (1%)



A: 1 - Padrão de Peso Molecular – 1 Kb ladder; 2 - Produto de PCR da região codificante dos dois domínios de collagenase (Full); 3 - do domínio de collagenase amino-terminal (D1); 4 - do domínio de collagenase carboxi-terminal (D2) e 5- dos dois domínios de collagenase (Full); B: 1 - Padrão de peso molecular – 1 Kb ladder; 2, 4 e 6- DNA dos clones pAE-Full, pAE-D1 e pAE-D2 não digeridos; 3, 5 e 7: DNAs dos clones pAE-Full, pAE-D1 e pAE-D2 digeridos.

No vetor pAE, a expressão da proteína recombinante só ocorre na presença da T7 RNA polimerase. Para isto, foi utilizada a linhagem *E.coli* BL21-SI (LifeTechnologies) com o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor proU, induzível por NaCl.

Na purificação das proteínas recombinantes, colônias isoladas das transformações com as construções em pAE foram inoculadas em meio LBON (meio LB sem NaCl) suplementado com ampicilina. A cultura foi incubada a 30°C por 12-18 horas, sob agitação. Este pré-

inóculo foi transferido para meio fresco contendo ampicilina, utilizando-se uma diluição 1:20. A cultura será incubada novamente sob agitação até O.D.600nm = 0,6-0,8. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida com a adição de 300 mM de NaCl por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. As células foram coletadas por centrifugação. Posteriormente, o sedimento bacteriano foi ressuscitado em 5 volumes (p/v) de tampão 20 mM Tris-HCl, 0,3 M NaCl, 5mM imidazol e pH 8,0. A seguir, a suspensão bacteriana foi lisada através da passagem pelo *french-press*, em gelo.

A suspensão resultante da lise foi centrifugada. O sobrenadante (fração solúvel) e o sedimento (corpúsculos de inclusão-fração insolúvel) foram coletados e analisados em gel SDS-PAGE com 12 % de acrilamida.

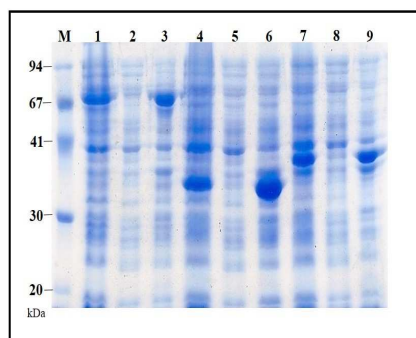
Como pode ser observado na figura 6A, as três proteínas recombinantes foram expressas na fração insolúvel e posteriormente, purificadas utilizando cromatografia de afinidade metálica (*Fast Flow chelating Sepharose* - GE Healthcare). Para tanto, o sedimento de corpúsculos de inclusão foi ressuscitado em 10 volumes (p/v) de tampão de solubilização (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5mM imidazol, 0,1% de triton (v/v), 8M uréia e pH 7,9) e mantido a temperatura ambiente por 2 horas com agitação. Posteriormente, o solubilizado foi diluído 100X em 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5mM imidazol e pH 7,9, lentamente. Esta solução foi adsorvida à coluna de afinidade a metal, previamente carregada com 5 volumes de 100 mM NiSO₄ e equilibrada com 3 volumes de tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5mM imidazol e pH 7,9). Para eliminação das proteínas contaminantes, a resina foi lavada com 10 volumes do tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5mM imidazol e pH 7,9) e 20 volumes do tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 60 mM de imidazol e pH 7,9). A proteína recombinante foi eluída com 6 volumes do tampão de eluição (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 1 M imidazol e pH 7,9) e dialisada contra PBS.

A figura 6B mostra o resultado da purificação das proteínas recombinantes após a diálise, na qual é possível verificar que a maioria das proteínas contaminantes foi eliminada no processo de purificação e as proteínas recombinantes apresentaram bandas majoritárias com tamanhos de acordo com as massas moleculares esperadas: 74,80 kDa; 35,83 kDa e 44,94 kDa para *Full*, D1 e D2, respectivamente.

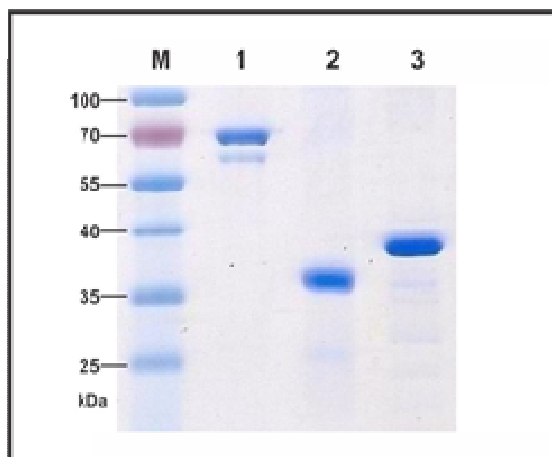
Para verificar a eficácia do processo de obtenção das proteínas após a purificação foi realizado *Western-blotting* utilizando o anticorpo monoclonal anti-histidina. O vetor pAE possibilita a expressão de proteínas heterólogas em fusão com uma cauda de seis resíduos de histidina na porção amino-terminal, que foi reconhecida pelo anticorpo anti-histidina, como é mostrado na figura 6C.

Figura 6 - A- Análise da expressão e solubilidade das proteínas recombinantes em pAE-Full, pAE-D1, pAE-D2 gel SDS-PAGE (10%). B - Análise da purificação das proteínas recombinantes em gel de poliacrilamida (SDS-Page 12%). C - *Western-Blotting* utilizando as proteínas recombinantes purificadas e o anticorpo anti-histidina

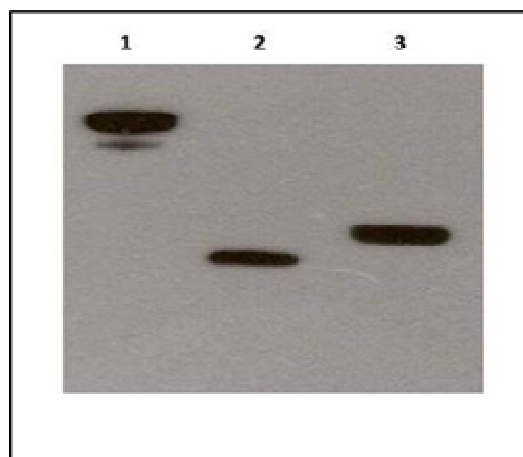
A



B



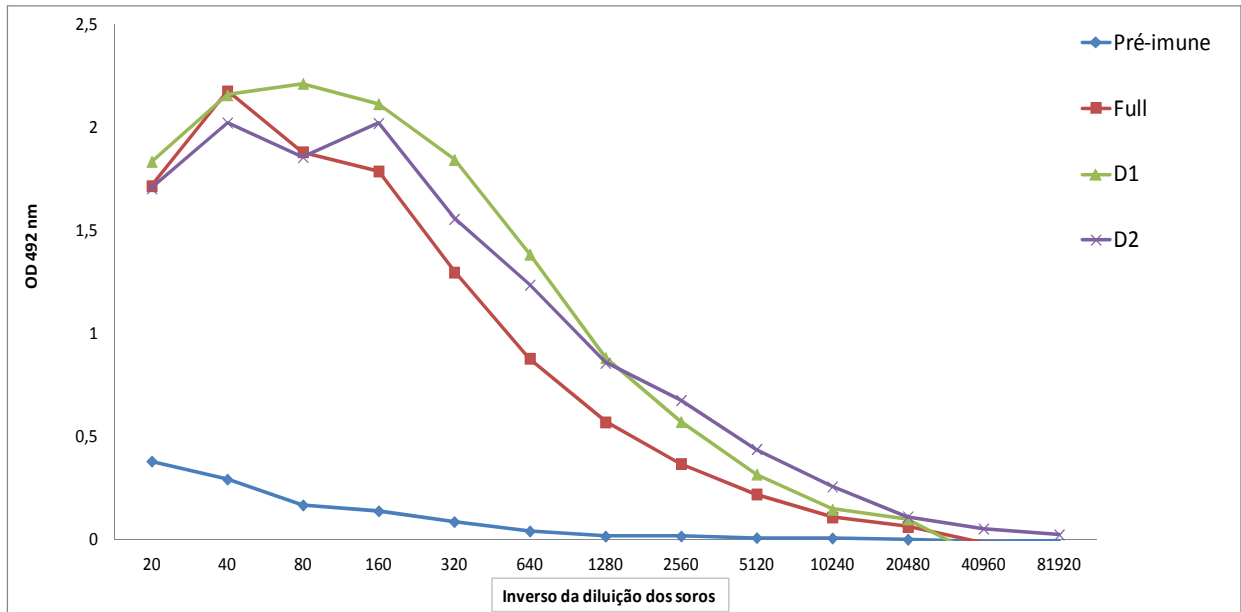
C



A - M- Padrão de Peso molecular; 1, 4 e 7- Lisado total induzido; 2, 5 e 8- Sobrenadante após lise e centrifugação Full, D1 e D2, respectivamente; 3, 6, 9- Sedimento de corpúsculos de inclusão (fração insolúvel) após lise e centrifugação Full, D1 e D2, respectivamente; B - M – Padrão de peso molecular; 2-Proteína Full;3-Proteína D1; 4- Proteína D2; C - 1 - Proteína Full; 2 - Proteína D1; 3 - Proteína D2

As proteínas recombinantes purificadas foram inoculadas em coelhos para obtenção dos soros hiperimunes. Na figura 7, são mostradas as respectivas curvas de titulação. É possível observar que todas as proteínas são imunogênicas, pois apresentaram altos títulos específicos. Estes soros policlonais serão utilizados nas etapas seguintes de caracterização da ColA.

Figura 7 - Curvas de titulação de IgG total obtidas por *ELISA* utilizando os soros dos coelhos imunizados com as proteínas recombinantes purificadas e o controle pré-imune

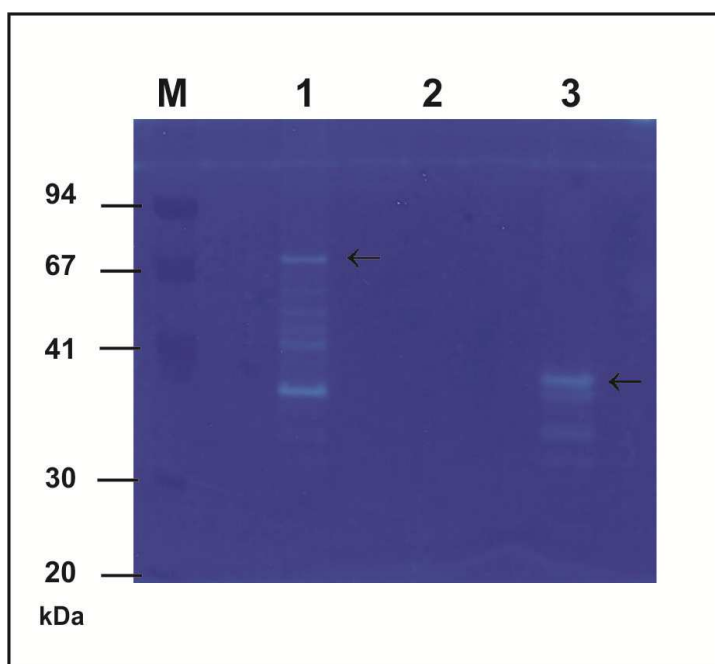


4.3 As proteínas Full e D2 apresentaram atividade catalítica sobre o colágeno desnaturado e sobre peptídeo sintético: A ColA é uma peptidase colagenolítica, sendo o domínio D2 o responsável pela atividade enzimática. Entretanto, esta atividade não foi inibida por inibidores específicos de metaloproteases, como fenotrolina e EDTA e nem por inibidores de outras famílias:

A atividade proteolítica das proteínas Full, D1 e D2 foi avaliada utilizando zimografia em gel de gelatina (1 mg/mL). Para tanto, aproximadamente, 2 µg de cada proteína recombinante purificada foram aplicados em gel SDS-PAGE 10%. Após a eletroforese, o SDS foi removido do gel por lavagens com solução de Triton X-100 2,5% e a incubação ocorreu em tampão contendo 0,02% de triton X-100, 10 mM de CaCl₂, 1µM de ZnSO₄ e 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 a 37°C, durante a noite. Posteriormente, o gel foi corado com Coomassie R250 e descorado. A coloração com Coomassie permitiu a identificação da atividade proteolítica, detectada pelo aparecimento de bandas claras contra um fundo azul. Na figura 8, é possível observar a atividade genatinolítica das proteínas recombinantes Full e D2. A proteína D1 não foi capaz de degradar gelatina. Demonstrando que o domínio D2 é o responsável pela atividade proteolítica da ColA. As bandas claras, que aparecem abaixo das bandas marcadas com as setas, correspondem aos produtos resultantes da degradação das

proteínas recombinantes. Isto ocorreu, provavelmente, devido a incubação por longo período a 37°C.

Figura 8 - Análise da atividade genatinolítica das proteínas recombinantes *Full*, D1 e D2 purificadas. Zimografia em gel com gelatina



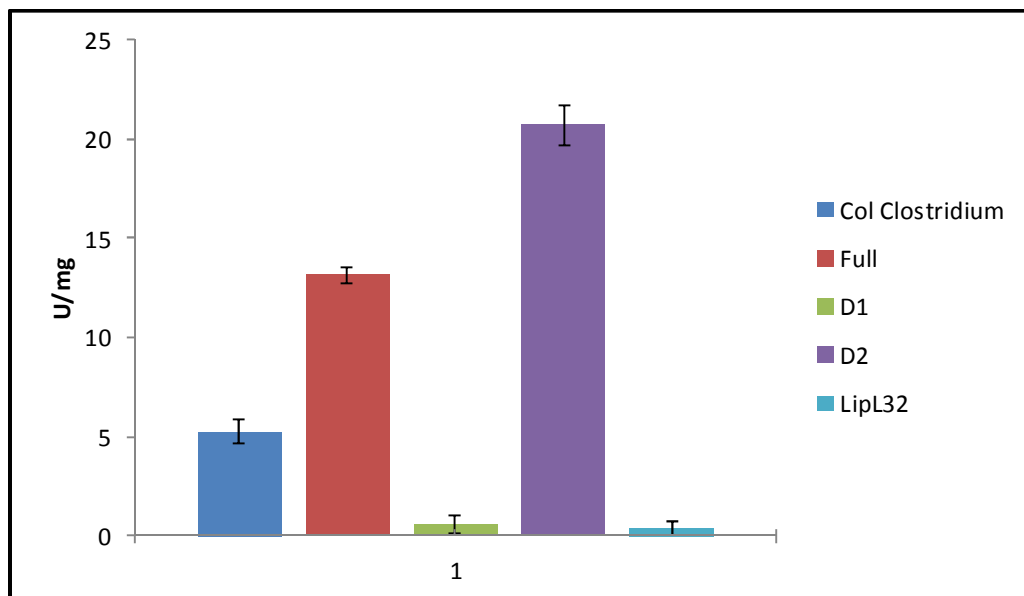
M- Padrão de Peso molecular (LMW); 1- Proteína Full; 2- Proteína D1; 3- Proteína D2.

As proteínas recombinantes purificadas, também, foram avaliadas quanto à capacidade de hidrolisar o peptídeo de colágeno, utilizando o substrato sintético carbobenzoxi-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala-OH. Este substrato ao ser hidrolisado pela enzima libera carbobenzoxi-Gly-Pro-Gly e Gly-Pro-Ala-OH, este último reage com ninhidrina e pode ser quantificado pela leitura espectrofotométrica a 565nm. A reação foi realizada em 0,1 M tampão citrato pH 6,3; por 5 minutos a 37°C.

A colagenase do *Clostridium histoliticum* tipo IA foi utilizada como controle positivo e a proteína recombinante LipL32 (gentilmente cedida pela aluna de doutorado Tatiana Barrinuevo Gotti) como controle negativo. A figura 9 mostra que a colagenase do *C. histoliticum* apresentou uma atividade enzimática específica média de 5,23 U/mg. Enquanto, as proteínas D1 e LipL32 não foram capazes de hidrolisar o substrato (0,56 e 0,49 U/mg, respectivamente). As proteínas recombinantes *Full* e D2 foram capazes de clivar o substrato sintético, com atividade enzimática específica média de 13,14 e 20,70 U/mg de proteína,

respectivamente. Uma unidade é a quantidade de enzima capaz de formar 1µmol de produto por minuto. Estes resultados são comparáveis aos obtidos por Kassegne et al., (2014), que mostraram a atividade de collagenase da proteína ColA inteira recombinante e a nativa purificada sobre colágenos tipos I, II, III e IV e substrato sintético. Estes dados confirmaram os resultados obtidos com a zimografia e mostram que a proteína ColA é uma peptidase colágenolítica e que o segundo domínio de collagenase é o responsável pela sua atividade enzimática.

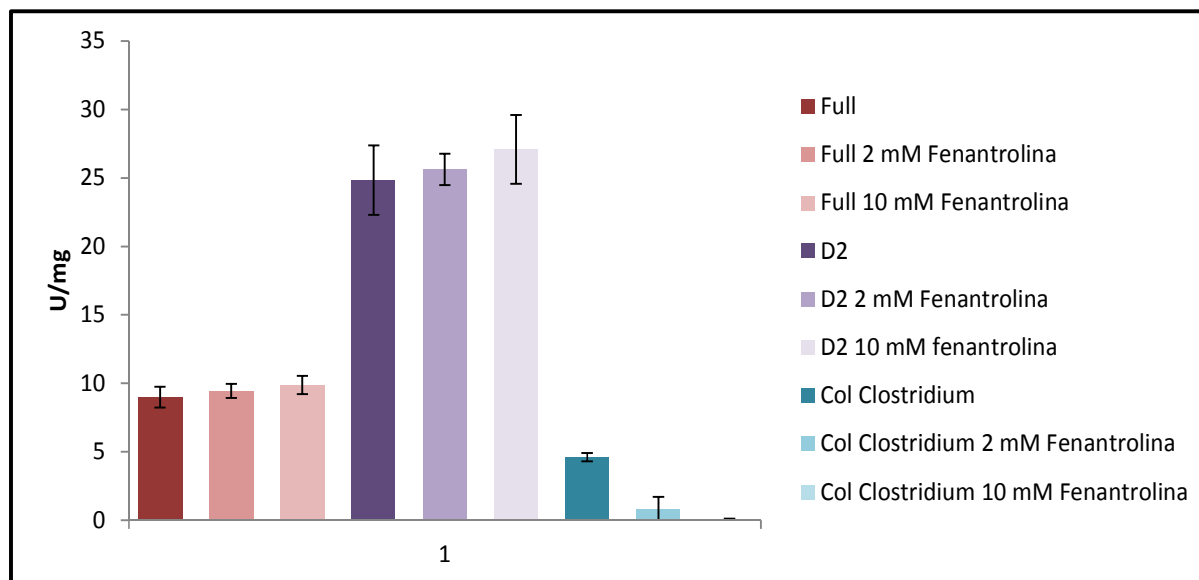
Figura 9 - A atividade de collagenase foi determinada pelo método de hidrólise do peptídeo Pz. Os valores são médias +/- desvio padrão das quadruplicatas medidas. A proteína recombinante LipL32 foi usada como controle negativo e a collagenase de *C. histoliticum*, como controle positivo



Para identificar a classe de inibidor enzimático e a família a qual a ColA pertence, diferentes tipos de inibidores foram incubados com as proteínas recombinantes por 30 minutos a temperatura ambiente antes da reação proteolítica. Um teste controle sem a presença do inibidor foi realizado concomitantemente a inibição. Como pela análise *in silico* o domínio D2 apresentou uma sequência consenso de ligação ao zinco (HEXXH), iniciamos os testes com inibidores específicos para metaloproteases: a fenatrolina e o EDTA.

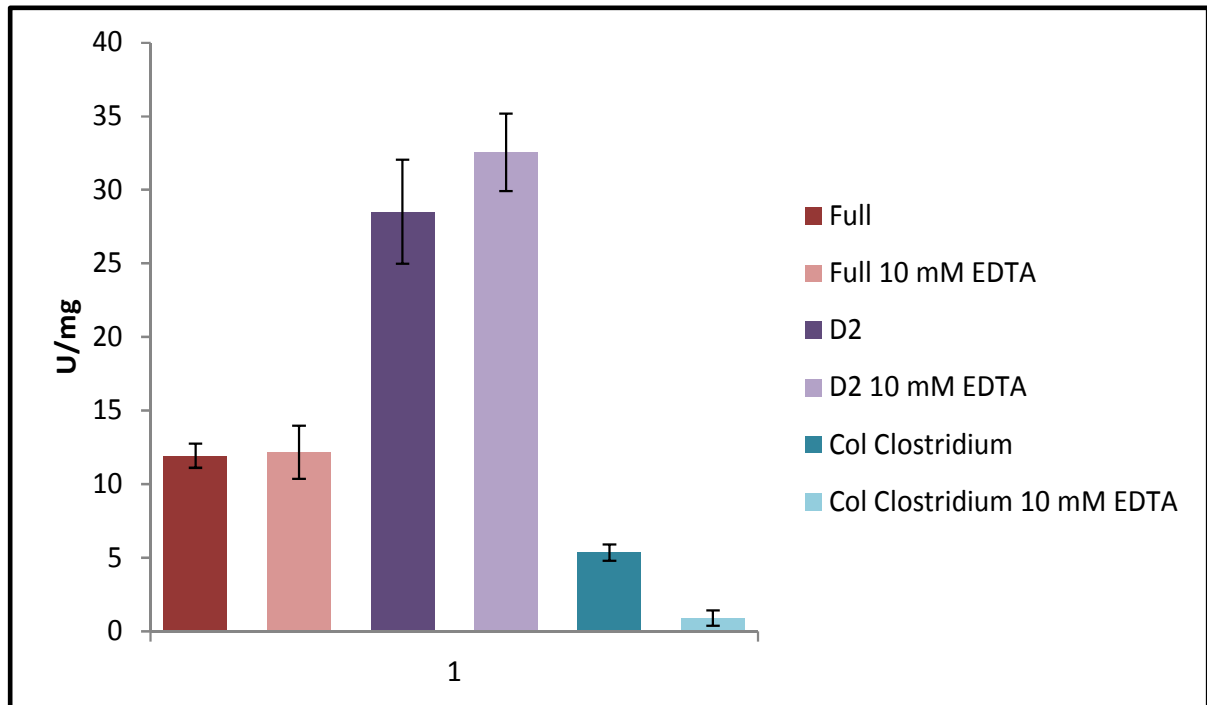
A figura 10 mostra o teste de inibição utilizando duas concentrações diferentes de fenatrolina (2 e 10 mM). É possível notar que a atividade peptidásica das proteínas recombinantes *Full* e D2 sobre o substrato sintético não foi inibida por fenatrolina. Enquanto, a atividade da collagenase do *C. histoliticum*, que é uma metaloprotease já caracterizada, foi totalmente abolida com a presença de 10 mM de fenatrolina.

Figura 10 – A collagenase do *Clostridium histoliticum* e as proteínas recombinantes purificados foram submetidas ao método de hidrólise do peptídeo Pz com adição do inibidor de metaloprotease, fenantrolina. Os valores são médias +/- desvio padrão das quadruplicatas medidas



O mesmo resultado anterior foi observado quando as proteínas foram incubadas com 10 mM de EDTA, também um inibidor de metaloprotease, como mostrado na figura 11. Somente ocorreu a inibição da atividade da collagenase do *C. histoliticum*.

Figura 11 – A colagenase do *Clostridium histoliticum* e as proteínas recombinantes purificadas foram submetidas ao método de hidrólise do peptídeo Pz com adição do inibidor de metaloprotease, EDTA. Os valores são médias +/- desvio padrão das quadruplicatas medidas



As figuras 12, 13 e 14 mostram que os inibidores E-64 (cisteinoproteases), pepstatina A (asparticoproteases) e PMSF (serinoproteases), respectivamente, também não inibiram as atividades das proteínas *Full* e *D2* sobre substrato sintético, o mesmo ocorreu com a atividade da colagenase do *C. histoliticum*, neste último caso, isto já era esperado pelo fato desta enzima ser uma metaloprotease.

Figura 12 – A colagenase do *Clostridium histoliticum* e as proteínas recombinantes purificados foram submetidas ao método de hidrólise do peptídeo Pz com adição do inibidor de cisteinoproteases, E-64. Os valores são médias +/- desvio padrão das quadruplicatas medidas

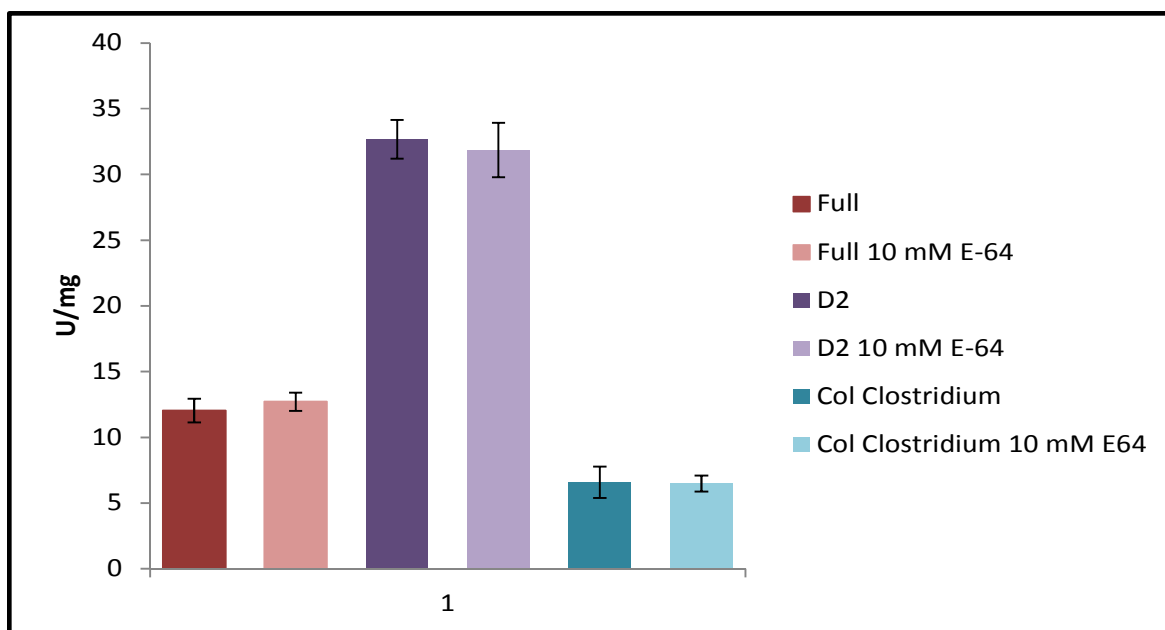


Figura 13 - A colagenase do *Clostridium histoliticum* e as proteínas recombinantes purificados foram submetidas ao método de hidrólise do peptídeo Pz com adição do inibidor de asparticoproteases, pepstatina A. Os valores são médias +/- desvio padrão das quadruplicatas medidas

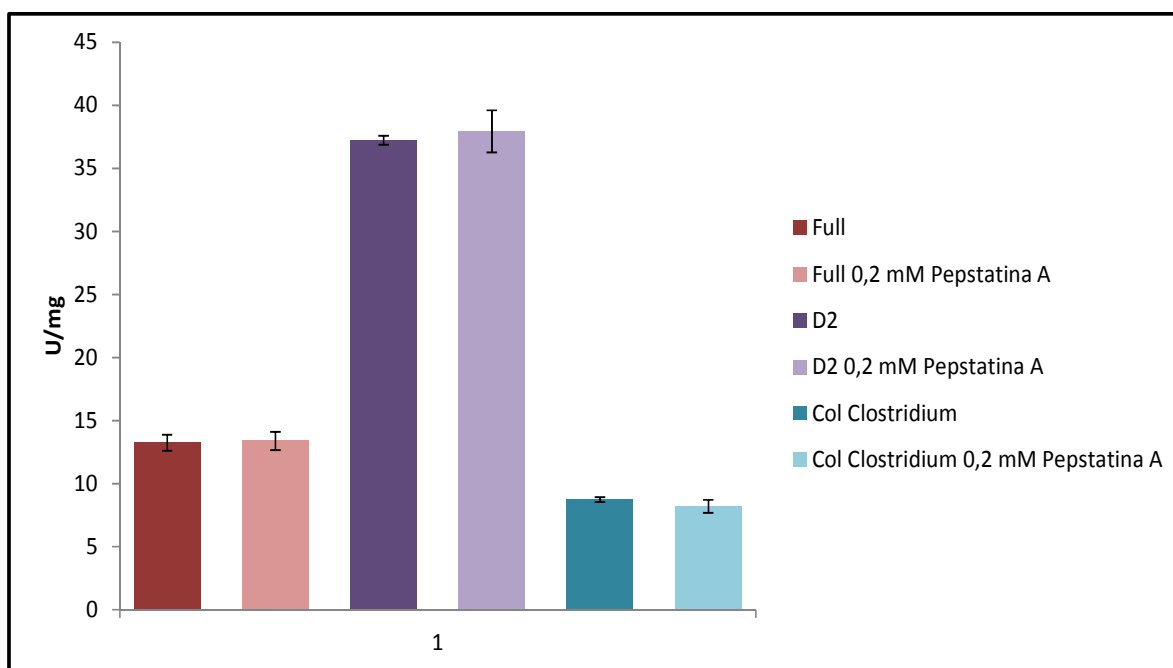
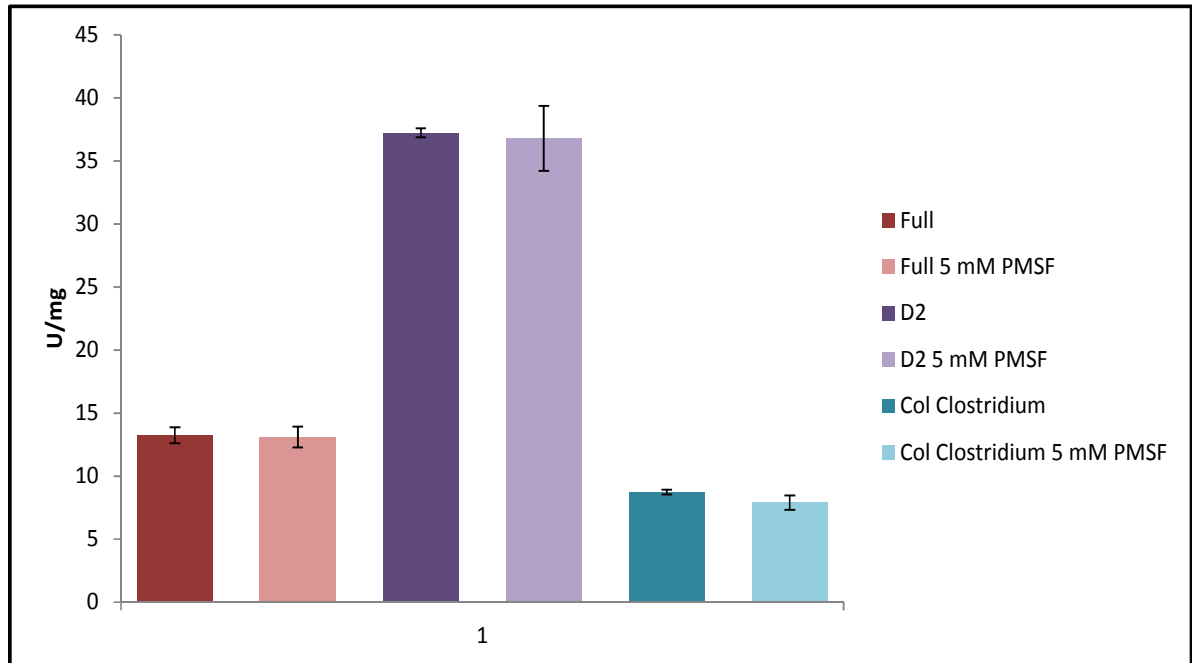
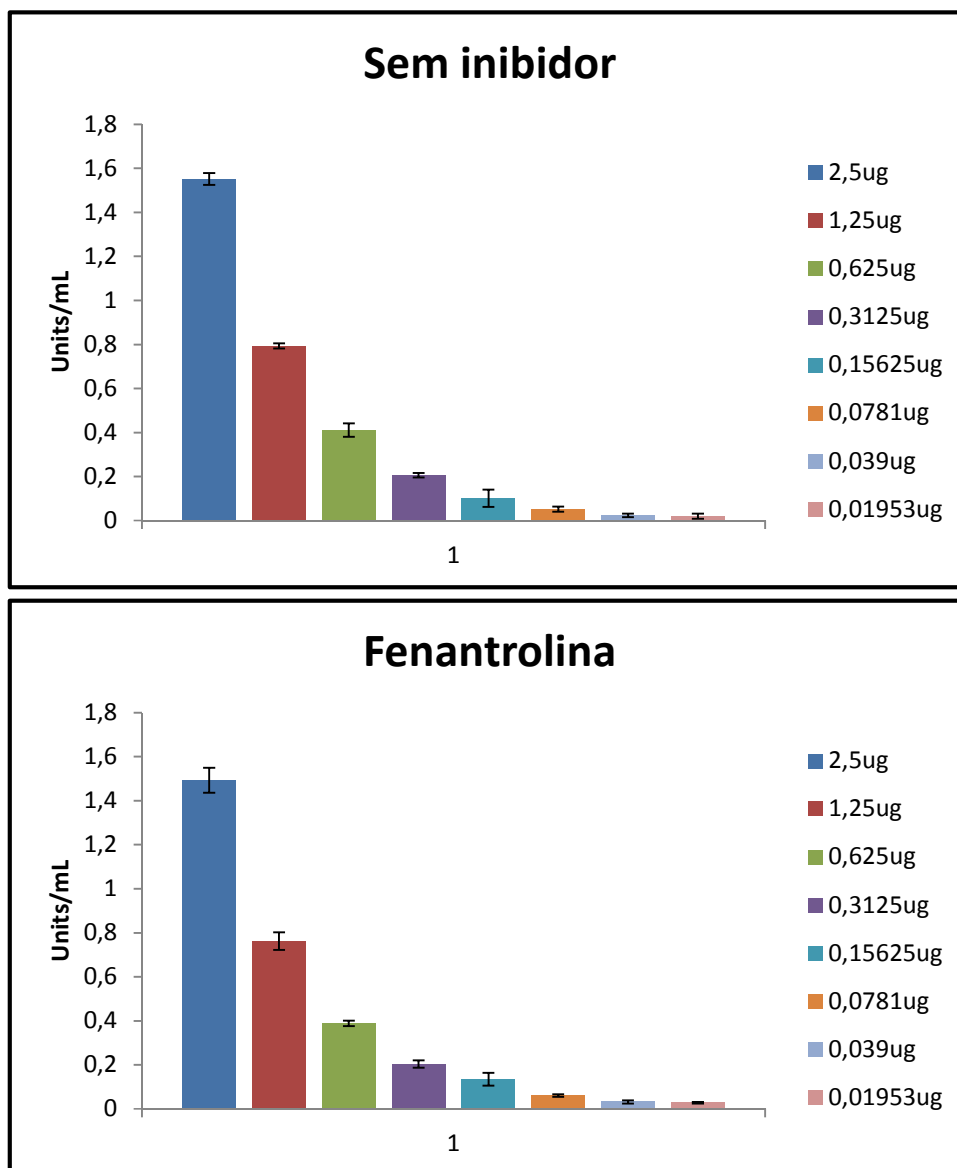


Figura 14 - A colagenase do *Clostridium histoliticum* e as proteínas recombinantes purificadas foram submetidas ao método de hidrólise do peptídeo Pz com adição do inibidor de serinoproteases, PMSF. Os valores são médias +/- desvio padrão das quadruplicatas medidas



Para a determinação da relação entre enzima e inibidor que pudesse promover a inibição da atividade, foram testadas quantidades decrescentes da proteína D2 com e sem inibidor específico de metaloprotease, a fenatrolina (10 mM). Neste caso, a atividade específica foi calculada em U/ml. Na figura 15, é possível observar que não houve mudança no perfil obtido na ausência e presença de fenatrolina, confirmando os resultados anteriores obtidos.

Figura 15 – A colagenase do *Clostridium histoliticum* e as proteínas recombinantes purificados foram submetidas ao método de hidrólise do peptídeo Pz na ausência e presença do inibidor de metaloprotease, fenantrolina. Os valores são médias +/- desvio padrão das quadruplicatas medidas

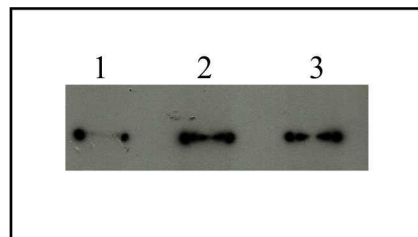


4.4 A proteína ColA nativa é expressa na presença de colágeno:

Análise de *Western blotting*, utilizando extratos totais de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 cultivada em meio EMJH a 29°C mostraram que a produção da proteína nativa é baixa ou ausente (Figura 16, poço 1). Na presença de 1µg/ml e 3 µg/ml de colágeno tipo IV no meio do cultivo a produção é aumentada (Figura 16, poços 2 e 3). Estes

resultados são equivalentes aos obtidos por Kassegne et al. (2014), que mostraram a expressão da ColA nativa em *L.interrogans* sorovai Lai só é detectada na co-incubação das leptospiras com células HUVEC e HEK293. Em meio de cultivo de leptospiras EMJH ou no meio de cultivo de células DMEM não há produção de ColA. Estes resultados indicam que a ColA possa ter um papel relevante durante a infecção.

Figura 16 – *Western blotting*, utilizando extratos totais de *L.interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 cultivada em meio EMJH na presença e ausência de colágeno tipo IV



Gel 10% SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com soro policlonal anti-D1. A reação com o primeiro anticorpo foi realizada em uma diluição de 1/500 durante uma hora, seguido de incubação com o segundo anticorpo IgG anti-coelho conjugado com peroxidase (diluição 1/5.000). Extratos totais de *L.interrogans* cultivada em meio EMJH na presença e ausência de colágeno tipo IV: 1- sem Colágeno; 2- com 1µg/ml e 3- 3 µg/ml de colágeno tipo IV.

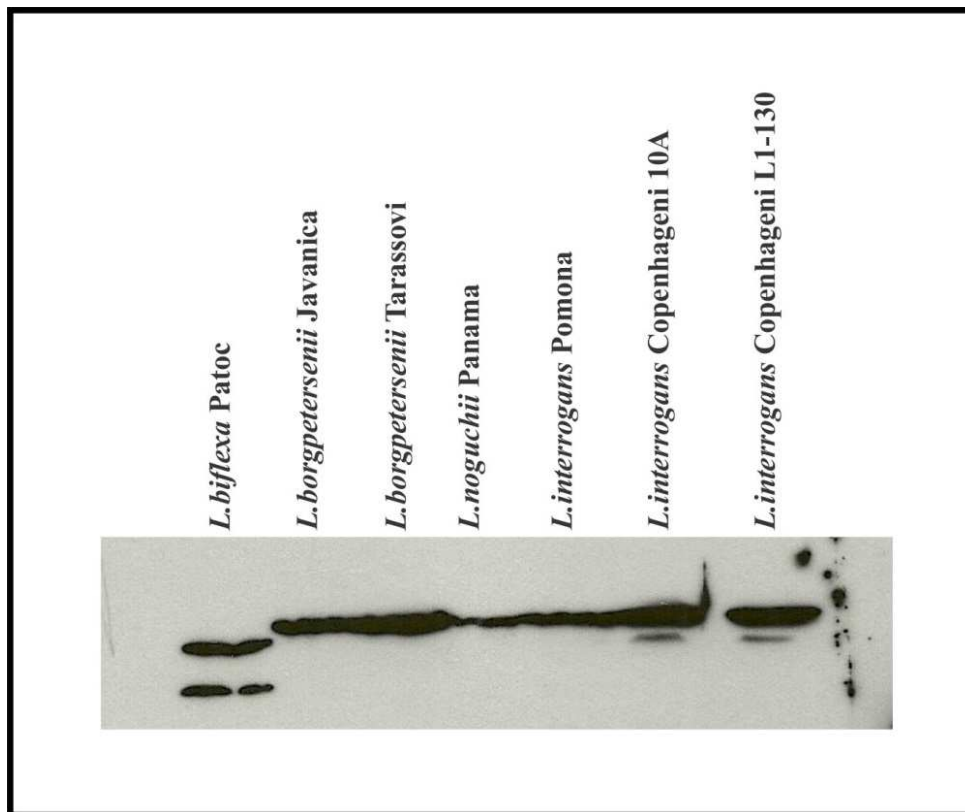
4.5 A proteína ColA é conservada em diferentes sorovares de leptospiras patogênicas e ausente na espécie saprófita.

Com o objetivo de conhecer a presença e distribuição da proteína ColA nas diferentes leptospiras patogênicas e na espécie saprófita, um alinhamento de sequências de aminoácidos obtidas do banco de dados NCBI e um experimento de *Western-blotting* foram realizados.

A figura 17 mostra o alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas de seis estirpes de leptospira patogênicas (*L. interrogans* serovar Copenhageni L1-130, *L. interrogans* serovar Lai strain 56601, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis strain L550, *L. noguchii* e *L. weilii*), indicando que esta proteína é altamente conservada. Estes resultados foram confirmados por *Western-blotting*, utilizando extratos totais de diferentes sorovares de leptospiras obtidos a partir de cultivos em meio EMJH na presença de 1µg/ml de colágeno tipo IV. A reação com o primeiro anticorpo foi realizada em uma diluição de 1/500 durante uma hora, seguido de incubação com o segundo anticorpo IgG anti-

coelho conjugado com peroxidase (diluição 1/5.000), por uma hora. A detecção foi realizada através da utilização de “kit” ECL (Amershan). A figura 18 mostra que o soro feito em coelho contra a proteína recombinante D2 foi capaz de reconhecer especificamente a banda correspondente a proteína ColA nativa em extratos totais nos sorovares de leptospiros patogênicas. No extrato protéico da *L. biflexa* sorovar Patoc (saprófita) ocorreu o reconhecimento de uma banda de tamanho menor, provavelmente esta banda não corresponde à proteína ColA, pois no genoma desta espécie não há ortólogos e nem sequências proteicas similares. Dessa forma, os resultados apresentados mostraram que esta proteína é expressa nos principais sorovares patogênicos, inclusive naqueles envolvidos na leptospirose humana, sugerindo que possam ter um papel relevante na patogenicidade.

Figura 18 – *Western-blotting*, utilizando extratos totais de diferentes sorovares de leptospiros obtidos a partir de cultivos em meio EMJH na presença de 1µg/ml de colágeno tipo IV



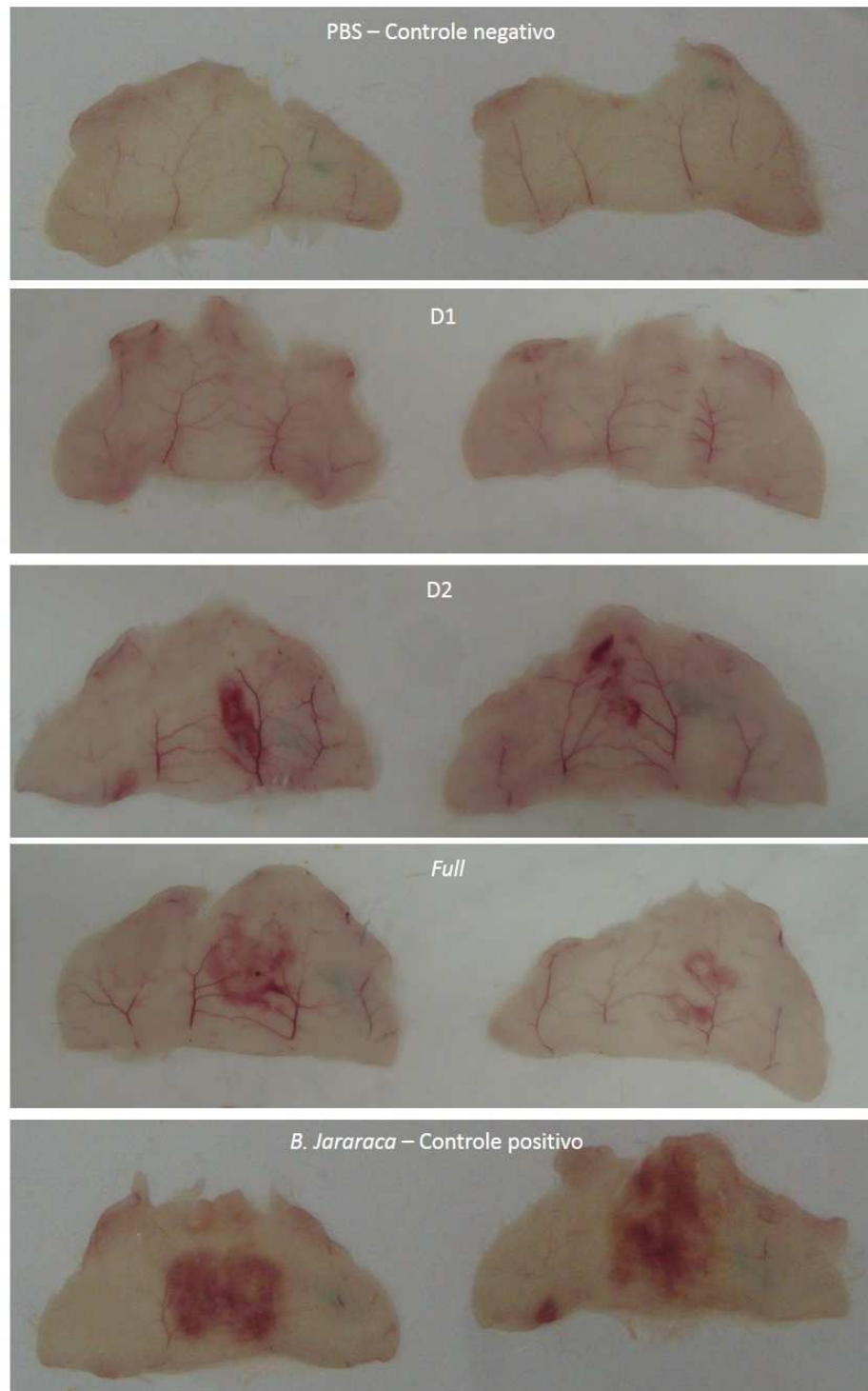
Gel 10% SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com soro policlonal anti-D2. A reação com o primeiro anticorpo foi realizada em uma diluição de 1/500 durante uma hora, seguido de incubação com o segundo anticorpo IgG anti-coelho conjugado com peroxidase (diluição 1/5.000)

4.6 A proteínas recombinantes Full e D2 apresentaram atividade hemorrágica.

A atividade hemorrágica das proteínas recombinantes purificadas foi determinada pela inoculação intradérmica na pele ventral dos camundongos suíços. Como referência utilizou-se a mesma atividade específica de proteínas Full e D2, que correspondeu 1U de atividade específica (20 µg proteína total de Full e 120 µg proteína total de D2). No caso da proteína D1, foram inoculadas 100 µg de proteína total e como controle positivo 1µg de veneno bruto de *Botrops jararaca*. Todas as amostras foram diluídas em PBS em um volume final de 200µL.

Na figura 19, é possível observar o halo hemorrágico causado pela inoculação das proteínas *Full* e D2 e do veneno de jararaca. A proteína D1 e o tampão PBS não induziram hemorragia após injeção intradérmica em camundongos.

Figura 19 – Atividade hemorrágica das proteínas recombinantes purificadas e do veneno de jararaca como controle positivo e PBS como controle negativo. Inoculação intradérmica na pele ventral dos camundongos suíços



Estes resultados são muito importantes, pois demonstram que a ColA pode causar hemorragias no hospedeiro infectado. Na leptospirose, os sangramentos que se originam de lesões nas microvasculaturas pulmonares estão relacionados com as formas graves da doença designadas por síndrome pulmonar hemorrágica e que na maioria dos casos leva ao óbito (BORGES; AB'SABER; BARBAS, 2005).

O tecido pulmonar de seres humanos infectados por leptospiras apresenta, usualmente, uma pequena quantidade de bactérias, o que indica serem os efeitos pulmonares decorrentes da exposição de proteínas produzidas pelo patógeno em sítios distantes tais como fígado e rins (DOLHNIKOFF et al., 2007). Além disso, a disseminação das leptospiras pelos órgãos do hospedeiro é mediada, provavelmente, pela secreção de enzimas que destroem as membranas das células (BRANGER et al., 2001; CARVALHO et al., 2009).

Um estudo realizado por Diener, Carrick e Berck, (1973) demonstrou que as lesões hemorrágicas nos pulmões e duodeno de camundongos infectados eram causadas pela colagenase de *P. aeruginosa*.

Vargaftig, Lefort e Giroux, (1976) verificaram a atividade hemorrágica da colagenase de *Clostridium* sobre a superfície de pulmão de cachorro e camundongo, sugerindo que o efeito hemorrágico tinha sido causado devido aos danos nos vasos sanguíneos resultante da atividade colagenolítica. Esse efeito foi bloqueado quando as colagenases de *Clostridium* foram pré-incubada com inibidores específicos.

O número de óbito decorrente de hemorragia pulmonar em pacientes com leptospiroses tem aumentado. Segundo Barthi et al. (2003), em aproximadamente 70 % dos casos de leptospirose grave, a hemorragia pulmonar está associada a presença *L. interrogans*.

Recentemente, um estudo realizado por Kassegne et al. (2014) com mutante, no qual o gene que codifica a proteína ColA de *L. interrogans* sorovar Lai foi deletado, demonstrou uma significativa atenuação na capacidade da bactéria translocar através da monocamada celular de eucariotos. E no mesmo trabalho, em um ensaio com hamsters demonstrou que os animais infectados tinham um número menor de leptospiras circulando no sangue na fase inicial da infecção e observou um menor dano nos órgãos internos desses animais, quando comparados com ensaios realizados com as estirpes selvagens.

Os resultados obtidos neste trabalho, juntamente com os dados da literatura indicam que a proteína ColA é um importante fator de virulência de *L. interrogans* durante a infecção. A caracterização funcional desta colagenase pode contribuir para a elucidação dos mecanismos que causam a hemorragia pulmonar e, também, no desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento e prevenção de leptospirose.

5 CONCLUSÕES

- ✓ O gene LIC12760 codifica uma provável lipoproteína de localização extracelular, com dois domínios de colagenase (D1 e D2), sendo que o domínio D2 possui ainda uma sequência consenso de ligação ao zinco, característico de metaloproteases;
- ✓ Três fragmentos recombinantes da ColA foram produzidos, que correspondem aos dois domínios catalíticos de colagenase (*Full*), ao domínio de colagenase amino-terminal (D1) e ao domínio de colagenase carboxi-terminal (D2). As proteínas recombinantes (*Full*, D1 e D2) foram expressas na fração insolúvel e purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel;
- ✓ As proteínas *Full* e D2 apresentaram atividade catalítica sobre o colágeno desnaturado e sobre peptídeo sintético: A ColA é uma peptidase colagenolítica, sendo o domínio D2 o responsável pela atividade enzimática. Entretanto, esta atividade não foi inibida por inibidores específicos de metaloproteases, como fenotrolina e EDTA e nem por inibidores de outras famílias;
- ✓ A proteína ColA nativa é expressa na presença de colágeno.
- ✓ A proteína ColA nativa é conservada em diferentes sorovares de leptospiras patogênicas e ausente na espécie saprófita.
- ✓ As proteínas recombinantes *Full* e D2 apresentaram atividade hemorrágica.
- ✓ Os resultados obtidos neste trabalho, juntamente com os dados da literatura indicam que a proteína ColA é um importante fator de virulência de *L. interrogans* durante a infecção.
- ✓ A caracterização funcional desta colagenase pode contribuir para a elucidação dos mecanismos que causam a hemorragia pulmonar e, também, no desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento e prevenção de leptospirose.

REFERÊNCIAS

- ABREU, P. A.; MIYASATO P. A.; VILAR, M. M.; DIAS W. O.; HO, P. L.; TENDLER, M.; NASCIMENTO, A.L. Sm14 of *Schistosoma mansoni* in fusion with tetanus toxin fragment C induces immunoprotection against tetanus and schistosomiasis in mice. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5931-5937, 2004.
- ANTELMANN, H.; TJALSMA, H.; VOIGT, B.; OHLMEIER, S.; BRON, S. A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. **Genome Research**, v. 11, n. 9, p. 1484-1502. 2001.
- BAROCCHI, M. A.; KO, A. I.; REIS, M. G.; MCDONALD, K. L.; RILEY, L. W. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6926-6932, 2002.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 757-771, 2003.
- BORGES, E. R.; AB'SABER, A. M.; BARBAS, C. S. V. Síndromes hemorrágicas pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, p. 36-43, 2005.
- BRANGER, C. ; SONRIER, C. ; CHATRENET, B. ; KLONJKOWSKI, B. ; RUVOEN-CLOUET, N. ; AUBERT, A. ; ANDRÉ-FONTAINE, G. ; ELOIT, M. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6831-6838, 2001.
- BRANGER, C.; CHATRENET, B.; GAUVRIT, A.; AVIAT, F.; AUBERT, A.; BACH, J. M.; ANDRÉ-FONTAINE, G. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 4062-4069, 2005.
- BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGER, F.; WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and sorovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp nov and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 839-858, 1999.
- BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 39, p. 14560-14565, 2006.

BURNETTE, W. N. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, v. 112, n. 2, p. 195-203, 1981.

CARVALHO, E.; BARBOSA, A. S.; GÓMEZ, R. M.; CIANCIARULLO, A. M.; HAUKE, P.; ABREU, P. A.; FIORINI, L. C.; OLIVEIRA, M. L.; ROMERO, E. C.; GONÇALES, A. P.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HO, P. L. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. **FEBS Letters**, v. 583, n. 8, p. 1381-1385, 2009.

Pseudomonas aeruginosa. **Infection and Immunity**, v. 7, n. 2, p. 212-217, 1973.

DOLHNIKOFF, M.; MAUAD, T.; BETHLEM, E. P.; CARVALHO, C.R. Leptospiral pneumonias. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v.13, n. 3, p. 230-235, 2007.

EYMAN, C.; MACH, H.; HARWOOD, C. R.; HECKER, M. Phosphate-starvation-DIENER, B.; CARRICK JR, L.; BERKS, R. S. In vivo studies with collagenases from inducible proteins in *Bacillus subtilis*: a two-dimensional gel electrophoresis study. **Microbiology**, v. 142, n. 11, p. 3163–3170, 1996.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. 2nd ed. Melbourne, Australia: MediSci, 1999.

FARR, R. W. Leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, p. 1-8, 1995.

FUKASAWA, K. M.; HATA, T.; ONO, Y.; HIROSE, J. Metal preferences of zinc-binding motif on metalloproteases. **Journal of Amino Acids**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

GEER, L.Y.; DOMRACHEV, M.; LIPMAN, D. J.; BRYANT, S. H. CDART: protein homology by domain architecture. **Genome Research**, v. 12, n.10, p. 1619-23, 2002.

HAAKE, D.A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v. 146, p. 1491-1504, 2000.

HANTKE, K.; BRAUN, V. Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murien lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. **European Journal of Biochemistry**, v. 34, p. 284-296, 1973.

HARRINGTON, D. J. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 1885-91, 1996.

KO, A. I.; GALVAO REIS, M.; RIBEIRO DOURADO, C. M.; JOHNSON, W. D.; RILEY JR, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, v. 354, p. 820-825, 1999.

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

JIANG, W.; BOND, J. S. Families of metalloendopeptidases and their relationships. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 312, n. 2/3, p. 110-114, 1992.

KASSEGNE, K.; HU, W.; OJCIUS, D.M.; SUN, D.; GE, Y.; ZHAO, J.; YANG, F.; LI, L.; YAN, J. Identification of a collagenase as a critical virulence factor for invasiveness and transmission of pathogenic *Leptospira* spp. **Journal of Infectious Diseases Advance Access**, v. 209, n. 3. p. 1-11, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEBER, T. M.; BALKWILL, F. R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. **Analytical Biochemistry**, v. 249, n.1, p. 24-28, 1997.

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

LEVETT, P. N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 447-452, 2003.

LOMAR, A.V.; DIAMENT, D.; TORRES, J. R. Leptospirosis in Latina America. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 14, n. 1, p. 23-39, 2000.

MADATHIPARAMBIL, M. G.; CATTAVARAYANE S.; MANICKAM, G. D.; SINGH, K.; PERUMANA, S. R.; SEHGAL, S. C. A zymography analysis of proteinase activity present in *Leptospira*. **Current Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 917-22, 2010.

MADATHIPARAMBIL, M. G.; CATTAVARAYANE S.; MANICKAM, G. D.; SINGH, K.; PERUMANA, S. R.; SEHGAL, S. C. Presence of 46 kDa gelatinase on the outer membrane of *Leptospira*. **Current Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1478-82, 2011.

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

MATSUSHITA, O.; YOSHIHARA, K.; KATAYAMA, S.; MINAMI, J.; OKABE, A. Purification and characterization of a *Clostridium perfringens* 120-Kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. **Journal of Bacteriology**, v. 176. n. 1, p. 149-156, 1994.

MATSUSHITA, O.; JUNG, C. M.; MINAMI, J.; KATAYAMA, S.; NISHI, N.; OKABE, A. A study of the collagen-binding domain of a 116-kDa *Clostridium histolyticum* collagenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 3643-3648, 1998.

MATSUSHITA, O.; JUNG, C. M.; KATAYAMA, S.; MINAMI, J.; TAKAHASHI, Y.; OKABE, A. Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum*. **The Journal of Bacteriology**, v. 181. n. 3, p. 149-156, 1999.

MERIEN, F.; BARANTON, G. PEROLAT, P. Invasion of Vero Cells and Induction of Apoptosis in Macrophages by Pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 729-738, 1997.

MURRAY, P.M.; ROENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. Treponema, Borrelia e Leptospira. **Microbiologia Médica**. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000 p. 285-288.

NAKAI T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox* (Western Diamondback rattlesnake). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 231, n. 2, p. 309-319, 1984.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164-2172, 2004a.

NASCIMENTO, A. L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO C. B.; CAMARGO L. E. A.; DIGIAMPIETRI, L. A.; HARSTKEERL, R. A.; HO, P. L.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; HAAKE D. A.; MARTINS, E. A. L. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 459-477, 2004b.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One**, v. 3, n. 2, p. 1607, 2008.

RAMACHANDRAN, G. N. Stereochemistry of collagen. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1988.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A. E.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1103-1109, 2004.

REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A. X.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G.; KO, A.I. Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 23, n. 4, p. 228, 2008.

REN, S. X.; FU, G.; JIANG, X. G.; ZENG, R.; MIAO, Y. G.; XU, H.; ZHANG, Y. X.; XIONG, H.; LU, G.; LU, L. F.; JIANG, H. Q.; JIA, J.; TU, Y. F.; JIANG, J. X.; GU, W. Y.; ZHANG, Y. Q.; CAI, Z.; SHENG, H. H.; YIN, H. F.; ZHANG, Y.; ZHU, G. F.; WAN, M.; HUANG, H. L.; QIAN, Z.; WANG, S. Y.; MA, W.; YAO, Z. J.; SHEN, Y.; QIANG, B. Q.; XIA, Q. C.; GUO, X. K.; DANCHIN, A.; SAINT GIRONS, I.; SOMERVILLE, R. L.; WEN, Y. M.; SHI, M. H.; CHEN, Z.; XU, J. G.; ZHAO, G. P. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 888-893, 2003.

RICALDI, J. N.; FOUTS, D. E.; SELENGUT, J. D.; HARKINS, D. M.; PATRA, K. P.; MORENO, A.; MATTHIAS, M. A. Whole Genome Analysis of *Leptospira icterohaemolyticum* Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, p. 1-16, 2012.

SANKARAN, K.; WU, H.C. Bacterial lipoprotein. In Schlesinger, M.J. (ed.) Lipid Modification of protein. Boca Raton, London: CRC Press, 1993. p. 163-181.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SATO, Y.; COWELL, J. R.; SATO, H.; BURSTYN, D. G.; MANDARCK, C. R. Separation and purification of the hemagglutinins from *Bordetella pertussis*. **Infection and immunity**, v. 41, p. 313-320, 1983.

SEYDEL, A.; GOUNON, P.; PUGSLEY, A. P. Testing the +2 rule for lipoprotein sorting in the *Escherichia coli* cell envelope with a new genetic selection. **Molecular Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 810-821, 1999.

SETUBAL, J.C.; REIS, M.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D.A. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. **Microbiology**, v. 152, p. 113-121, 2006.

SUPURAN, C. T.; SCOZZAFAVA, A.; CLARE, B. W. Bacterial protease inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, n. 4, p. 329-372, 2002.

TAKEUCHI, H.; SHIBANO, Y.; MORIHARA, K.; FUKUSHIMA, J.; INAMI, S.; KEIL, B.; GILLES, A.M.; KAWAMOTO, S.; OKUDA, K.; Structural gene and complete amino acid sequence of *Vibrio alginolyticus* collagenase. **Biochemical Journal**, v. 281, p. 703-708, 1992.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009. p. 9-44. (Documento 353).

VAN DER REST, M.; GARRONE, R. Collagen family of proteins. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 13 p. 2814-2823, 1991.

VARGAS, D. M.; AUDÍ, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 367-70, 1997.

VARGAFTIG, B. B.; LEFORT, J.; GIROUX, E. L. Haemorrhagic and inflammatory properties of collagenase from *C. histolyticum*. **Agents and Actions**, v. 6, n. 5, p. 627-635, 1976.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 527-538, 2001.

YAMAGUCHI, K.; YU, F.; INOUE, M. A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E.coli*. **Cell**, v. 53, n. 3, p. 423-432, 1988.

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G.; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F.; ROGER, F.; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and sorovars for seven new *Leptospira* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 407-415, 1987.

YU, N. Y.; WAGNER, J. R.; LAIRD, M. R.; MELLI, G.; REY, S.; LO, R.; DAO, P.; SAHINALP, S. C.; ESTER, M.; FOSTER, L. J.; BRINKMAN, F. S. L. PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**, v. 26, n. 13, p. 1608-1615, 2010.

WATANABE, K. Collagenolytic proteases from bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 520-526, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. Geneva: **WHO**, 2003

WU, H. C. Biosynthesis of lipoprotein. In: *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C. p. 1005-1014, 1996.

WU, J. W.; CHEN, X. L. Extracellular metalloproteases from bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 253-262, 2011.