LUDMILA BEZERRA DA SILVA

Identificação de Proteases de *Leptospiras* Envolvidas na Degradação de
Proteínas da Matriz Extracelular e do Plasma Humano

São Paulo
2017

LUDMILA BEZERRA DA SILVA

Identificação de Proteases de *Leptospiras* Envolvidas na Degradação de
Proteínas da Matriz Extracelular e do Plasma Humano

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Angela Silva Barbosa

Co-orientador:

Dra. Tatiana Rodrigues Fraga

São Paulo
2017

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3535
FMVZ

Silva, Ludmila Bezerra da
Identificação de proteases de *Leptospira* envolvidas na degradação de proteínas da matriz extracelular e do plasma humano. / Ludmila Bezerra da Silva.
-- 2017.

66 p. : il.

Acompanha 1 CD-ROM que contém tabelas complementares.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Angela Silva Barbosa.

Co-orientador: Profa. Dra. Tatiana Rodrigues Fraga

1. *Leptospira*. 2. Proteases. 3. Matriz extracelular. 4. Cascata de coagulação. I.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Identificação de proteases de leptospira envolvidas na degradação de proteínas da matriz extracelular", protocolado sob o nº 3087/2013, utilizando 10 (dez) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Angela Silva Barbosa, foi aprovado em reunião de 16/10/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Identification of Leptospira proteases involved in the degradation of extracellular matrix proteins", protocol number 3087/2013, utilizing 10 (ten) mice, under the responsibility Profa. Dra. Angela Silva Barbosa, was approved in the meeting of day 16/10/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 17 de outubro de 2013.

Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente no exercício

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Ludmila Bezerra da

Título: Identificação de proteases de *Leptospira* envolvidas na degradação de proteínas da matriz extracelular e do plasma humano.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico a Deus e a minha família
por toda força e iluminação.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus por toda oportunidade, inspiração e força por esses últimos quatro anos. Minha vida se move na direção ao melhor, mesmo que em alguns momentos encontrei caminhos difíceis, mas sempre sabendo que estava seguindo a melhor direção.

Á minha orientadora Dra. Angela, que sempre será para mim meu exemplo de paciência, otimismo e dedicação. Agradeço pela confiança que sempre depositou em mim durante esses 9 anos juntas. Não sei o caminho que o destino me reserva nessa nova etapa, mas pode ter certeza que levarei comigo todos os seus ensinamentos.

Á minha co-orientadora Dra. Tatiana Fraga, por toda paciência, dedicação e ensinamento. Obrigada por tudo.

Á minha família amada, meus pais Nilson e Angelita, minhas irmãs Nadia e Larissa e meus sobrinhos Cassius e Benício você são a luz da vida, minha vida não faria nenhum sentido sem vocês do meu lado. Agradeço por todo incentivo e compreensão para que eu realizasse meu sonho. Amo vocês .

Á minha amiga de graduação e de bancada Denize Monaris, responsável por ter seguido esse caminho, saiba que sou extremamente grata. Agradeço por todo o ensinamento, paciência, companhia, incentivo e por ter uma pessoa tão iluminada na minha vida.

Á minha eterna “baby” Lúcia Miragaia, minha companheira de bancada você não sabe a falta que sinto de você trabalhando do meu lado. Agradeço por toda paciência, amizade, viagens, risadas e incentivo. Obrigada minha “baby”.

Aos meus “topinhos” Afonso Abreu, Claudia Trigo e Fernanda Andrade. Vocês são extremamente essenciais na minha vida. Obrigada por toda amizade, conselhos, confidências, risos, choros, incentivos, diversão e carinho. Amo vocês.

Á minha amiga Matilde Costa, minha nova companheira de banca e de muitas aventuras. Obrigada por toda amizade, risada, por me suporte nos meus momentos de estresse. Obrigada minha amiga.

Aos meus amigos e companheiros do lab. 9 Demétria Fazolo, Ligia Piassi, Tatiana Gotti, Larissa Matos, Natalia Salazar, Luiz Eduardo, Joana Dias, Bruno Yamamoto, Kamila Nunes, obrigada pela convivência, ensinamentos, ajudas e pelos momentos de descontração com muitas risadas.

Aos meus amigos Lab. Bac., piratinhas e agregados Afonso Abreu, Bruno Yamamoto, Bruna Caetano, Camila Souza, Claudia Trigo, Dani Luz, Dani Munhoz, Emerson Shiga, Fernanda Andrade, Fernando Martins, Jonathan Longo, Juliana Higa, Larissa Matos, Lúdia Miragaia, Matilde Costa, RafaEU, Roberto Lima e Thais Mitsunari vocês realmente fizeram todas a diferença em minha vida nesses últimos anos. Obrigada pelos bons cafés, nossas “uminhas” e nossas festas sucessos. Vocês moram no meu coração.

Aos pesquisadores e funcionários do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Agradeço pela convivência com pessoas dedicadas e comprometidas com que fazem.

Á Prof. Dra. Lourdes Isaac e todos os alunos do Laboratório de Sistema Complemento da USP. Agradeço pelos ensinamentos e por toda ajuda no que fosse preciso.

Á Prof. Dra. Solange Serrano Instituto do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – LETA – Instituto Butantan em especial aos seus alunos Milene Menezes, Ana Karina e Eduardo Kitano, por toda a paciência, ensinamentos e discussões durante esses anos. Agradeço por toda ajuda prestada.

Ao Prof. Marcos Bryan , Gisele, Antonio e Zenaide do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, por toda auxílio prestado.

Á todos os pesquisadores, funcionários e alunos do Departamento Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) em especial ao Danival, por toda paciência e dedicação.

Á FAPESP pelo apoio financeiro.

*Três tipos de fé são necessárias na vida.
A primeira é fé em si mesmo.
A segunda é ter fé no fato de haver boas pessoas na sociedade,
e há bondade ao seu redor
O terceiro tipo de fé é fé no único poder Supremo.*

Sri Sri Ravi Shankar

RESUMO

SILVA, L.B. Identificação de proteases de *Leptospira* envolvidas na degradação de proteínas da matriz extracelular e do plasma humano. 2017. 66 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Leptospiras são bactérias espiroquetas altamente móveis dotadas de estratégias que possibilitam grande eficiência nos processos de invasão e disseminação no hospedeiro. Nosso grupo demonstrou previamente que leptospiras patogênicas secretam proteases capazes de clivar e inativar moléculas-chave do sistema complemento humano, o que confere a essas bactérias a capacidade de driblar os mecanismos de defesa do sistema imune inato. Dada a rápida disseminação das leptospiras durante o processo de infecção, aventou-se a hipótese de que essas proteases secretadas pudessem alvejar uma gama maior de moléculas do hospedeiro. No presente estudo, a atividade proteolítica de proteínas secretadas por leptospiras sobre um painel de moléculas da matriz extracelular e do plasma foi avaliada. O sobrenadante de cultura da estirpe virulenta *L. interrogans* sorovar Kennewicki Fromm degradou fibrinogênio humano, fibronectina plasmática, colágeno Tipo I, e as proteoglicanas decorina, biglicam e lumican. A atividade proteolítica foi inibida por 1,10-fenantrolina, sugerindo o envolvimento de metaloproteases. Laminina, matrigel, plasminogênio e trombina não foram clivados por proteases presentes nos sobrenadantes. Ainda, os dados indicam que a produção de proteases deve ser um determinante de virulência importante, uma vez que os sobrenadantes de estirpes saprófitas ou patogênicas atenuadas em cultura não apresentaram atividade proteolítica sobre componentes da matriz ou do plasma. A análise dos genomas de leptospiras disponíveis nos levou à identificação de quatro termolisinas, metaloproteases presentes apenas nas espécies patogênicas. Uma delas, codificada pelo LIC13322, foi produzida na forma recombinante e apresentou atividade proteolítica sobre fibrinogênio, biglicam e decorina. Em paralelo, foram também realizadas análises comparativas dos exoproteomas das estirpes Fromm e Patoc I. Algumas metaloproteases que podem estar envolvidas na degradação de moléculas do hospedeiro foram identificadas. A capacidade de clivar moléculas do tecido conjuntivo e proteínas da cascata de coagulação pode certamente contribuir para a invasão e a destruição tecidual observadas durante a infecção por *Leptospira*.

Palavras-chave: *Leptospira*, proteases, matriz extracelular, cascata de coagulação.

ABSTRACT

SILVA, L.B., Identification of *Leptospira* proteases involved in the degradation of extracellular matrix and plasma proteins. 2017. 66 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Leptospire are highly motile spirochetes equipped with strategies for efficient invasion and dissemination within the host. Our group previously demonstrated that pathogenic leptospire secrete proteases capable of cleaving and inactivating key molecules of the human complement system, allowing these bacteria to circumvent host's innate immune defense mechanisms. Given the successful dissemination of leptospire during infection, we wondered if such proteases would target a broader range of host molecules. In the present study, the proteolytic activity of secreted leptospiral proteases against a panel of extracellular matrix and plasma proteins was assessed. The culture supernatant of the virulent *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Fromm degraded human fibrinogen, plasma fibronectin, collagen Type 1, and the proteoglycans decorin, biglycan, and lumican. Proteolytic activity was inhibited by 1,10-phenanthroline, suggesting the participation of metalloproteases. Laminin, matrigel, plasminogen and thrombin were not cleaved by proteases present in the supernatants. Moreover, production of proteases might be an important virulence determinant since culture-attenuated or saprophytic *Leptospira* did not display proteolytic activity against ECM or plasma components. A search against *Leptospira* genomes allowed identification of four thermolysins, which are metalloproteases found exclusively in pathogenic species. One of them, encoded by LIC13322, was produced in the recombinant form and displayed proteolytic activity against fibrinogen, biglycan and decorin. Comparative exoproteomic analyses using Fromm and Patoc I strains were also performed and allowed identification of a few metalloproteases that could be involved in the degradation of host components. The ability to cleave connective tissue molecules and coagulation cascade proteins may certainly contribute to invasion and tissue destruction observed upon infection with *Leptospira*.

Keywords: *Leptospira*, proteases, extracellular matrix, coagulation cascade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Icherohaemorrhagiae.....	17
Figura 2 - Espécies de <i>Leptospira</i> determinadas segundo a classificação genotípica.....	18
Figura 3 – Ciclo de transmissão da leptospirose.....	21
Figura 4 – Estratégia de evasão da <i>Leptospiras</i> patogênicas.....	24
Figura 5 – Localização dos genes que codificam as termolisinas de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	26
5	
Figura 6 – Representação esquemática da termolisina pelo gene LIC 13322 de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	34
Figura 7 - Esquema ilustrativo do método de análise utilizado para realização do exoproteoma.....	40
Figura 8 – Avaliação da atividade proteolítica dos secretados de leptospiros sobre componentes da matriz extracelular ou do plasma humano.....	43
Figura 9– Avaliação da atividade proteolítica do secretado de <i>L. interrogans</i> Fromm sobre o fibrinogênio.....	45
Figura 10 – Análise da atividade proteolítica presente no secretado de leptospira por zimografia.....	47
Figura 11– Identificação das classes de proteases de <i>Leptospira</i> envolvidas na clivagem dos componentes da matriz extracelular e do plasma humano.....	48
Figura 12 – Avaliação da atividade proteolítica dos diferentes secretados de leptospiros atenuados em cultura frente os componentes da matriz extracelular e plasma humano.....	50
Figura 13 – Perfil eletroforético da proteína recombinante purificada por pressurização.....	51
Figura 14 – Avaliação da atividade proteolítica da termolisina de <i>Leptospira</i> sobre o fibrinogênio.....	52
Figura 15 – Avaliação da atividade proteolítica da termolisina de <i>Leptospira</i> sobre as proteoglicanas.....	53
Figura 16 Diagrama de Venn.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Inibidores de proteases utilizados nos ensaios de inibição.....	36
Tabela 2 -	Proteases identificadas no exoproteoma.....	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Descrição das soluções utilização nos diversos procedimentos	29
------------	--	----

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 A BACTÉRIA <i>LEPTOSPIRA</i>	17
1.2 A LEPTOSPIROSE.....	19
1.2.1 Ciclo de transmissão e sintomatologia da leptospirose	19
1.2.2 Diagnóstico da leptospirose.....	21
1.2.3 Tratamento da leptospirose.....	22
1.2.4 Desenvolvimento de vacinas contra leptospirose.....	22
1.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE E EVASÃO IMUNE APRESENTADOS POR LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS	23
2. OBJETIVO	28
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 SOLUÇÕES E REAGENTES.....	29
3.2 ESPÉCIES DE <i>LEPTOSPIRA</i> E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	31
3.3 OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE LEPTOSPIRAS.....	31
3.4 ANTICORPOS E PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR E DO PLASMA HUMANO	31
3.5 OBTENÇÃO DE PLASMA HUMANO DEPLETADO DE ALBUMINA	32
3.6 EXPRESSÃO, RENOVELAMENTO E PURIFICAÇÃO DA TERMOLISINA RECOMBINANTE	32
3.7 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO E ANÁLISE DE AMOSTRAS	34
3.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e <i>Western blot</i>	34
3.7.2 Dosagem de proteína	35
3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DOS SECRETADOS DE LEPTOSPIRAS SOBRE COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR E DO PLASMA HUMANO.....	35
3.9 IDENTIFICAÇÃO DAS CLASSES DE PROTEASES ENVOLVIDAS NAS CLIVAGENS DOS COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR E DO PLASMA HUMANO UTILIZANDO INIBIDORES DE PROTEASE	36
3.10 ANÁLISE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA PRESENTE NO SECRETADO DE LEPTOSPIRAS POR ZIMOGRÁFIA	36

3.11 PREPARAÇÃO DO SECRETADO PARA ESPECTROMETRIA DE MASSAS PELO MÉTODO FASP (<i>Filter Aided Sample Preparation Method</i>).....	37
3.12 ANÁLISE DOS PROTEOMAS POR LC-MS/MS	38
3.13 BUSCA EM BANCOS DE DADOS E ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA DOS DADOS GERADOS	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DOS SECRETADOS DE LEPTOSPIRAS SOBRE PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR E COMPONENTES DA CASCATA DE COAGULAÇÃO.....	41
4.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA PRESENTE NO SECRETADO DE LEPTOSPIRAS POR ZIMOGRÁFIA	46
4.3 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA POR INIBIDORES DE PROTEASES	47
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE DIFERENTES SECRETADOS DE LEPTOSPIRAS ATENUADAS EM CULTURA FRENTE AOS COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR E DO PLASMA HUMANO.....	49
4.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TERMOLISINA RECOMBINANTE	50
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA TERMOLISINA RECOMBINANTE LIC13322 FRENTE A COMPONENTES DO HOSPEDEIRO.....	52
4.7 ANÁLISE DO EXOPROTEOMA DE <i>L. INTERROGANS</i> FROMM E <i>L. BIFLEXA</i> PATOC I.....	55
5. CONCLUSÕES	59
6. REFERÊNCIAS	61
7. LISTA DE ANEXOS (EM CD-ROM).....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 A BACTÉRIA *LEPTOSPIRA*

As leptospiros são bactérias helicoidais finas e móveis com aproximadamente 0,15 µm de diâmetro e 10 a 20 µm de comprimento (FIGURA 1). Apresentam extremidades em forma de gancho. Possuem dois flagelos localizados no espaço periplasmático que conferem movimentos de rotação e translação (LEVETT, 2001). São capazes de colonizar os túbulos renais proximais dos hospedeiros e são excretadas através da urina. No ambiente externo, podem sobreviver semanas e até meses em solo úmido e água (FAINE et al., 1999). A agregação de células e a formação de biofilme podem contribuir para que sobrevivam fora de seu hospedeiro (KO et al., 2009). Apresentam crescimento ótimo *in vitro* em temperaturas de 28 a 30° C.

Figura 1 – *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae

Microscopia eletrônica de varredura sobre membrana 0,2 µm. Fonte: (LEVETT, 2001).

As bactérias que causam leptospirose pertencem ao gênero *Leptospira*, família *Leptospiraceae* e ordem *Spirochaetales* (FAINE et al., 1999). O gênero *Leptospira* foi primeiramente dividido nas espécies *L. biflexa* e *L. interrogans* pela classificação fenotípica. *L. biflexa* reunia os sorovares saprófitos, de vida livre, e *L. interrogans* os patogênicos (LEVETT, 2001). Atualmente, as leptospiros são classificadas em mais de 300

sorovares considerando a heterogeneidade estrutural dos carboidratos dos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana da bactéria (PICARDEAU, 2017). Os sorovares patogênicos de *Leptospira* geralmente têm preferências específicas por determinados hospedeiros (por exemplo, sorovar Canicola infecta preferencialmente cães, sorovar Icterohaemorrhagiae preferencialmente ratos e sorovar Hardjo principalmente bovinos). No entanto, estas associações não são estritas, podendo o homem, por exemplo, ser infectado acidentalmente por qualquer um dos sorovares mencionados. Uma classificação genotípica para a determinação das espécies de *Leptospira* com base em experimentos de hibridação de DNA e análise filogenética por 16S rRNA vem sendo adotada e permitiu dividir o gênero *Leptospira* em três clados distintos compreendendo 22 espécies. Até então foram descritas dez espécies patogênicas que podem infectar e causar doenças em seres humanos e animais. Em outro clado enquadram-se cinco espécies intermediárias isoladas de seres humanos e animais que podem causar manifestações clínicas leves da doença. Do terceiro clado fazem parte sete espécies saprófitas que não causam doença (FIGURA 2).

Figura 2 – Espécies de *Leptospira* determinadas segundo a classificação genotípica.

Vinte e duas espécies de *Leptospira*, agrupadas em três clados distintos (patogênicas, intermediárias e saprófitas) foram descritas até então. Fonte: (PICARDEAU, 2017).

1.2 A LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, com maior incidência nas regiões tropicais. A doença afeta principalmente grupos de risco expostos a reservatórios de animais ou ambientes contaminados, como matadouros e esgoto, e praticantes de esportes aquáticos e recreativos. Estima-se que aproximadamente 1.000.000 de pessoas sejam acometidas pela doença anualmente, e em média 58.900 mortes por leptospirose são registradas em todo o mundo. A maioria dos pacientes pertence ao sexo masculino, e encaixa-se na faixa etária entre 20 e 49 anos (COSTA et al., 2015). No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica, mas nos períodos chuvosos se torna epidêmica nas capitais e regiões metropolitanas, devido às condições inadequadas de saneamento básico e aumento da infestação de roedores. No período de 2010 a 2014 foram confirmados no Brasil 20.810 casos da doença, representando uma média anual de 4.162 casos. O número de óbitos foi de 1.694, representando uma média de 339 óbitos por ano. Dos casos confirmados 65,3% evoluíram para a fase grave da doença e exigiram hospitalização (BRASIL, 2016).

A leptospirose é uma doença de notificação compulsória no Brasil. Tanto a ocorrência de casos suspeitos isolados como a de surtos devem ser notificadas, o mais rapidamente possível, para o desencadeamento das ações de vigilância epidemiológica e controle (BRASIL, 2009). No entanto, visto que muitos casos não são diagnosticados, outros não são informados pelos hospitais e, ainda, muitos deles são confundidos com outras doenças, como gripe e dengue, a real incidência da leptospirose pode ser significativamente maior do que aquela que consta nos registros.

1.2.1 Ciclo de transmissão e sintomatologia da leptospirose

Os principais reservatórios de leptospirosas patogênicas são os roedores, os mamíferos domésticos e selvagens. As bactérias são eliminadas na urina destes animais e contaminam a água e o solo. O principal reservatório urbano da doença é o *Rattus norvegicus*. Nos roedores, a leptospirose apresenta-se como uma infecção crônica e assintomática. Em outros mamíferos, podem ocorrer diferentes manifestações tais como abortos em bovinos e

uveítes em cavalos. Os roedores, considerados hospedeiros de manutenção, eliminam as bactérias através da urina, contaminando assim o ambiente. Os hospedeiros acidentais, como os seres humanos, animais domésticos e selvagens se contaminam indiretamente através da água e do solo ou diretamente pelo contato com urina desses roedores (LEVETT, 2001) (FIGURA 3). A maior parte das infecções ocorre em áreas urbanas (57%), seguida por áreas rurais (20%) e peri-urbanas (3%). Quanto ao ambiente de infecção, o mais frequente é o domiciliar (42%), seguido pelo ambiente de trabalho (17,5%) e lazer (6%) (BRASIL, 2016).

A doença humana pode variar em termos de gravidade de acordo com o sorotipo de *Leptospira* infectante, idade e condições de saúde e sistema imunológico do indivíduo acometido (ADLER et al., 2010). Na maioria dos casos, as manifestações clínicas são brandas e grande parte dos pacientes não chega a procurar assistência médica. Nos casos confirmados no Brasil entre 2010 e 2014, os seguintes sinais e sintomas foram registrados: febre (90%), mialgia (83%), cefaléia (44%), dor na panturrilha (59%), vômito (50%) e icterícia (44%) (BRASIL, 2016).

A apresentação clínica da doença é bifásica: a fase aguda ou septicêmica dura aproximadamente uma semana e precede a fase imune, caracterizada pela produção de anticorpos e excreção de leptospiros pela urina. Grande parte das complicações decorrentes da infecção associa-se à internalização das leptospiros nos tecidos durante a fase imune (LEVETT, 2001).

Figura 3 – Ciclo de transmissão da leptospirose

Os roedores, considerados hospedeiros de manutenção, eliminam as bactérias através da urina, contaminando assim o ambiente. Os hospedeiros acidentais, como os seres humanos, animais domésticos e selvagens se contaminam indiretamente através da água e do solo ou diretamente pelo contato com urina desses roedores. Fonte: (FRAGA (a) et al., 2014).

1.2.2 Diagnóstico da leptospirose

O diagnóstico clínico da leptospirose nem sempre é simples, pelo fato de os sintomas serem parecidos com os de outras doenças tropicais. Métodos laboratoriais podem auxiliar na confirmação da suspeita clínica. Na fase de bacteremia da doença, leptospiros podem ser isoladas de amostras de sangue e líquido cérebro-espinhal. Nesta fase, a taxa de crescimento dessas bactérias é baixa e a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR), sendo um método bastante sensível, pode ser adotada para detecção de leptospiros. Na transição da fase aguda para a fase imune, testes *ELISA* IgM podem ser utilizados (SILVA et al., 2007). Na fase imune da doença, o teste mais indicado considerado “gold standard”

pela Organização Mundial da Saúde é o teste de aglutinação microscópica (MAT). Neste teste, diversos sorovares de leptospiros são usados como antígenos. São coletadas amostras de soro de pacientes com intervalo de duas semanas e o aumento de quatro vezes ou mais nos títulos de anticorpos indicam resultados positivos.

1.2.3 Tratamento da leptospirose

O tratamento dos pacientes com leptospirose é feito com uso de antibióticos apropriados. Os antibióticos recomendados e as doses são baseadas na gravidade da doença. O tratamento com doxiciclina (100 mg) duas vezes por dia durante 7 dias é recomendado no caso de doença leve. A penicilina G a cada 6 horas por 7 dias é indicada para doença grave. Em caso de insuficiência renal a terapia de suporte inclui hemodiálise e quando há hemorragias pulmonares realiza-se ventilação mecânica (BHARTI et al., 2003).

1.2.4 Desenvolvimento de vacinas contra leptospirose

No campo veterinário, a leptospirose causa um impacto econômico significativo. Abortos e natimortos são ocorrências frequentes no gado infectado, exigindo amplas medidas de vacinação. As vacinas disponíveis são leptospiros inativadas ou frações de membrana externa (FRAGA et al., 2011). Em alguns países como Cuba, Rússia e China, essas vacinas são licenciadas para uso em humanos (FRAGA et al., 2011; BHARTI et al., 2003). No entanto, não conferem uma resposta dependente de células T e não há proteção cruzada, sendo sorovar-específicas, exigindo, assim, revacinações anuais. O desenvolvimento de vacinas de subunidade, compostas de proteínas imunogênicas, conservadas, poderia suprir essas limitações. Nesse sentido, os estudos têm se concentrado em proteínas de membrana externa (OMPs) e lipoproteínas (WANG et al., 2007, DELAGOSTIN et al., 2011, FRAGA et al., 2011).

Resultados promissores foram recentemente obtidos com preparações vacinais contendo uma região conservada da proteína de membrana *Leptospiral immunoglobulin-like protein B* (LigB) (CONRAD et al., 2017). Essa proteína, presente somente em sorovares patogênicos, é expressa apenas durante a infecção. Trata-se de uma proteína multifuncional que liga-se a uma variedade de componentes da matriz extracelular e

reguladores do sistema complemento humano contribuindo para o processo de evasão imune (CHOY et al., 2007; LIN et al., 2009; LIN et al., 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). Considerando o papel relevante dessa proteína na infecção, sua função protetora como antígeno vacinal vem sendo testada. Dados recentes mostraram que a região N-terminal de LigB confere proteção e imunidade esterilizante em modelo animal (CONRAD et al., 2017).

1.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE E EVASÃO IMUNE APRESENTADOS POR LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS

Nos últimos anos, pesquisas envolvendo fatores relacionados à patogênese da leptospirose vêm sendo realizadas. Leptospiras patogênicas possuem a habilidade de escapar aos mecanismos de defesa naturais do organismo ao evitar a lise mediada pelo sistema complemento, que representa a primeira barreira da imunidade inata do hospedeiro. Para burlar esse sistema, leptospiras patogênicas desenvolveram diferentes estratégias de evasão. Uma delas é a aquisição de reguladores solúveis do complemento do hospedeiro, como Fator H (FH) proteína de ligação a C4b (C4BP) e Vitronectina (Vn) (MERI et al., 2005; STEVENSON et al., 2007; BARBOSA et al., 2009; BARBOSA et al., 2010; SILVA et al., 2015). Em decorrência dessas interações, as três vias de ativação do complemento, assim como a via terminal, são reguladas negativamente. A aquisição de plasminogênio por leptospiras também contribui para os processos de evasão imune e invasão, uma vez que a plasmina gerada cliva C3b, C4b e C5, além de degradar fibrinogênio (WOLFF et al., 2013; VIEIRA et al., 2010). Ainda, proteases endogenamente produzidas pela bactéria clivam moléculas das três vias de ativação do complemento (FRAGA et al., 2014) (FIGURA 4).

Figura 4 – Estratégias de evasão de leptospiros patogênicas

Leptospiras escapam da ação do sistema complemento pelos seguintes mecanismos: 1) recrutamento de reguladores negativos do complemento como FH, C4BP e vitronectina; 2) aquisição de proteases do hospedeiro, como o plasminogênio que, uma vez convertido em plasmina, cliva proteínas do complemento como C3b, C4b e C5 na superfície da bactéria e 3) secreção de proteases que inativam o sistema complemento ao degradar C2, C3, C4 e FB. Esses mecanismos são estratégias universais empregadas por diversos agentes patogênicos, incluindo bactérias, vírus e fungos para contornar o ataque do sistema complemento. Fonte: (FRAGA et al., 2016).

A capacidade de driblar a resposta imune inata do hospedeiro no início de uma infecção é crucial para o sucesso do patógeno. No entanto, a colonização do organismo por agentes patogênicos requer também adesão. Leptospiras patogênicas ligam-se a células distintas, incluindo fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e células epiteliais dos rins. Ensaio *in vitro* demonstraram que diversas proteínas de leptospiros patogênicas ligam-se a diversos componentes da matriz extracelular incluindo laminina, colágenos I e IV, fibronectina celular e plasmática, fibrinogênio, elastina e proteoglicanos (revisado por PICARDEAU, 2017).

A atividade proteolítica é uma outra ferramenta fundamental empregada por diversos patógenos para superar as barreiras teciduais. A degradação de componentes da matriz extracelular favorece a propagação e disseminação de microrganismos no hospedeiro. Proteases secretadas por patógenos constituem uma importante classe de fatores de virulência, desempenhando funções relacionadas à invasão, evasão imune, nutrição e reprodução de certos parasitas (revisado por ARMSTRONG et al., 2006). Tais enzimas pertencem a diferentes classes e, como exemplos, podemos mencionar as metaloproteases, aspartilproteases, serinoproteases e cisteínoproteases produzidas por *Porphyromonas gingivalis* e *Plasmodium falciparum* (KURAMITSU, 1998; MCKERROW et al., 1993). Embora nem todos os patógenos produzam proteases pertencentes às diferentes categorias enzimáticas, é comum na literatura encontrar relatos atestando a secreção de pelo menos uma ou poucas proteases por grande parte dos microrganismos estudados. Metaloproteases da classe das termolisinas de *Enterococcus faecalis* e *Clostridium perfringens* são capazes de hidrolisar diversos substratos, incluindo colágenos, fibrinogênio, insulina e moléculas do sistema complemento (PARK et al., 2008; JIN et al., 1996).

A análise dos genomas de leptospiros disponíveis nos levou à identificação de uma classe de quatro termolisinas nas espécies patogênicas *L. interrogans* sorovar Lai e Copenhageni (FIGURA 5). Tais termolisinas apresentam elevado grau de similaridade com as metaloproteases acima mencionadas.

Figura 5 - Localização dos genes que codificam as termolisinas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

No genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni há quatro genes que codificam proteínas da família das termolisinas (em vermelho). Três deles encontram-se próximos no genoma (LIC13320, LIC13321 e LIC13322), e o quarto (LIC10715) localizado em outro *locus* gênico. O gene LIC13322 foi selecionado para estudo neste projeto. Fonte: (Modificado de NASCIMENTO et al., 2004).

Conforme mencionado, proteínas secretadas por espécies patogênicas de *Leptospira* clivam diversas moléculas do sistema complemento humano, inativando-as (FRAGA et al., 2014). Os sobrenadantes de cultura dos sorovares patogênicos inibem todas as três vias de ativação do complemento. O efeito inibitório observado correlaciona-se com a atividade proteolítica presente nesses sobrenadantes. As clivagens foram observadas tanto com proteínas do complemento purificadas quanto com soro normal, o que indica que as proteases exercem sua função em um contexto fisiológico e podem contribuir para a virulência bacteriana. A atividade proteolítica foi inibida por 1,10 fenotrolina, indicando um papel importante de metaloproteases nesse processo de degradação das proteínas do complemento. Uma das termolisinas acima mencionada parece contribuir com essas clivagens, uma vez que foi capaz de degradar a proteína C3 (FRAGA et al., 2014). Mais recentemente, a degradação de moléculas da via terminal do complemento por proteases secretadas por leptospiros foi avaliada, tendo essa mesma termolisina um papel importante na inativação de C6, que compõe o complexo de ataque à membrana (MAC) (AMAMURA et al., 2017).

Até então, poucos estudos abordaram a caracterização de proteases de *Leptospira* relacionadas ao processo de invasão. Já há alguns anos, um estudo relatou a presença de uma gelatinase de 46 kDa na membrana de sorovares patogênicos de *Leptospira* (MADATHIPARAMBIL et al., 2011). Mais recentemente, uma outra collagenase codificada pelo gene *colA* foi descrita como um fator de virulência, sendo capaz de hidrolisar diversos tipos de colágeno. Animais nocautes para esse gene apresentaram virulência atenuada (KASSEGNE et al., 2014).

Diante do exposto, o principal objetivo deste projeto foi expandir a análise da atividade proteolítica de *Leptospira* sobre substratos, incluindo moléculas da matriz extracelular e da cascata de coagulação. Dentre as proteases secretadas pela bactéria, selecionou-se a termolisina NprT (que possui ação sobre moléculas do complemento, conforme acima mencionado) para estudos de atividade proteolítica, pois esta enzima é a que possui maior grau de similaridade com proteases de outros patógenos que clivam proteínas de matriz extracelular. Realizou-se também uma análise proteômica das proteínas secretadas pela bactéria com o intuito de identificar novas proteases. A identificação e a caracterização de proteínas com capacidade de clivar proteínas de matriz extracelular e da cascata da coagulação é de grande importância, podendo contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e/ou preventivas que possam interferir no processo de invasão e destruição tecidual observados na leptospirose.

2. OBJETIVO

Este projeto tem por objetivo identificar proteases de *Leptospira* envolvidas na degradação de moléculas do hospedeiro.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliação de sorovares patogênicos e não patogênicos de *Leptospira* quanto à capacidade de secretar protease(s) que degradam moléculas da matriz extracelular e da cascata de coagulação
2. Identificação da natureza das proteases envolvidas através do uso de inibidores específicos
3. Expressão e purificação da termolisina codificada pela LIC13322 (NprT) de *L. interrogans* sorovar Copenhageni
4. Avaliação da capacidade da termolisina recombinante de degradar componentes da matriz extracelular e proteínas do plasma humano
5. Identificação de proteases secretadas por leptospiros por abordagem proteômica

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SOLUÇÕES E REAGENTES

No Quadro 1 estão descritas as soluções e reagentes utilizados.

Quadro 1 - Descrição das soluções utilizadas nos diversos procedimentos (continua)

Preparação de bactérias competentes
<ul style="list-style-type: none"> - Solução RF: cloreto de magnésio 1 M. - Solução RF I: acetato de potássio 30 mM, cloreto de potássio 100 mM, cloreto de manganês 50 mM, cloreto de cálcio 10 mM, glicerol 15%, pH 5,8. - Solução RF II: cloreto de potássio 10 mM, cloreto de cálcio 75 mM, Na-MOPS 10 mM, glicerol 15%, pH 6,8. Todas as soluções foram esterilizadas por filtração (filtro 0,22 µm) e armazenadas a 4° C.
Meios de Cultura para <i>Escherichia coli</i>
<ul style="list-style-type: none"> - LB: triptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1,0%. - LB-amp: meio LB com ampicilina 100 µg/mL. - LB-ágar: bacto-triptona 1%, extrato de levedo 0,5%, NaCl 1%, bacto-ágar 1,5%. - SOB: triptona 1,6%; extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 0,5% e cloreto de potássio 0,02%. - Todos foram autoclavados a 120° C por 20 minutos. Soluções estéreis dos antibióticos foram adicionadas segundo a concentração final desejada. Para os meios sólidos, foi acrescentado 1,5% de agar aos meios líquidos
Meio de cultura para <i>Leptospira spp</i>
<ul style="list-style-type: none"> - EMJH modificado: meio EMJH (<i>Difco</i>™ Laboratories, Sparks, Maryland, EUA) contendo 10% de soro de coelho enriquecido com L-asparagina 0,015%; piruvato de sódio 0,0015%, cloreto de cálcio 0,001%, cloreto de magnésio 0,001%, peptona 0,03% e extrato de carne 0,02%. - O meio foi autoclavado a 120° C por 20 minutos.
Purificação de Proteínas
<ul style="list-style-type: none"> - PBS: NaCl 1,37 M, KCl 0,027 M, Na₂HPO₄ 0,10 M e KH₂PO₄ 0,017 M, pH 7,4. - Tampão de lavagem do corpúsculo: PBS, NaCl 500 mM e β-mercaptoetanol 5 mM. - Tampão de solubilização do corpúsculo: PBS pH 7,4 e ureia 8M. - Solução de lavagem: PBS pH 7,4 e imidazol 5 mM. - Solução de eluição: PBS pH 7,4 e imidazol 5 mM e imidazol (20 mM – 1M). - Tampão de diálise: PBS e glicina 0,1%.
SDS-PAGE
<ul style="list-style-type: none"> - Acrilamida 30%: Acrilamida 29% e Bis-acrilamida 1%. - Tampão Tris-HCl pH 8,8: Tris-HCl 1,5 M e SDS 0,1 %, pH 8,8.

<ul style="list-style-type: none"> - Tampão Tris-HCl pH 6,8: Tris-HCl 1M e SDS 0,1 %, pH 6,8. - Persulfato de amônio 10%. - TEMED: N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina.
SDS-PAGE
<p>Tampão de aplicação 5x: Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%; β-mercaptoetanol 100 mM.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tampão de corrida: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%. - Solução corante: ácido acético glacial 10%, etanol 50% e <i>Coomassie Blue Brilliant</i> 0,25%. - Solução descorante: ácido acético glacial 10% e etanol 30%. - Solução secante: ácido acético glacial 10% e etanol 50%.
Coloração por prata
<ul style="list-style-type: none"> - Solução fixadora: 50 % etanol, 12% ácido acético e 0,05% formaldeído 37% - Solução álcool: etanol 30% - Solução tiosulfato de sódio: 0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ - Solução corante: 0,1% AgNO_3 e 0,075% formaldeído 37% - Solução reveladora: 2% Na_2CO_3 e 0,05% formaldeído 37% - Solução stop: 50% etanol e 12% ácido acético
Western Blot
<ul style="list-style-type: none"> - Tampão de transferência: Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, etanol 20% e SDS 0,037%, pH 8,3. - PBS: NaCl 1,37 M, KCl 0,027 M, Na_2HPO_4 0,10 M e KH_2PO_4 0,017 M, pH 7,4. - PBS-T: PBS Tween 20 0,05%. - Tampão de bloqueio: PBS-T contendo 10% de leite desnatado. - Solução de Ponceau: Ponceau S 0,1 % em ácido glacial 10%. - Solução de diluição de anticorpos: PBS-T contendo 5% de leite desnatado. - Solução de revelação: SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate (Pierce).
Espectrometria de Massas
<ul style="list-style-type: none"> - Solução UA: (uréia 8M em Tris HCl 0,1 M pH 8,5) - Solução Ditiotretitol: (DTT 0,02M em UA). - Solução de Iodoacetamida: (IAA 0,05M em UA), - Solução ABC: (NH_4HCO_3 0,05M em água MilliQ) e - Ácido trifluoracético: (TFA 10%)

3.2 ESPÉCIES DE *LEPTOSPIRA* E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As seguintes espécies de *Leptospira* foram utilizadas: *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (espécie patogênica virulenta), *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11 (espécies não-patogênicas), *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 10A, *L. kirshneri* sorovar Cynopteri estirpe 3522C e *L. noguchi* sorovar Panama estirpe CZ 214 (espécies patogênicas atenuadas em cultura). As bactérias foram cultivadas em meio EMJH modificado à temperatura de 28-30°C por sete dias. Essas cepas são regularmente mantidas no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. A virulência da estirpe Fromm se mantém por inoculações sucessivas em hamsters.

3.3 OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE LEPTOSPIRAS

As bactérias foram cultivadas por sete dias em meio EMJH modificado, conforme descrito acima. Após centrifugação, as leptospiplas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,4, contadas em microscópio de campo escuro utilizando-se uma câmara de Petroff-Hausser e ressuspensas em PBS de forma a se obter 1×10^9 bactérias. As suspensões bacterianas foram incubadas a 37°C por 4 h para que ocorresse a secreção de proteases. Os sobrenadantes foram coletados após centrifugação, filtrados e estocados a -80°C para realização dos ensaios subsequentes.

3.4 ANTICORPOS E PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR E DO PLASMA HUMANO

Fibronectina plasmática, laminina, fibrinogênio, plasminogênio e trombina foram adquiridos da *Sigma-Aldrich*. Matrigel e colágeno tipo I foram adquiridos da *Corning-BD*. As proteoglicanas biglicam, decorina e lumican foram adquiridas da *R&D*. Nos ensaios

proteolíticos com a termolisina recombinante foi utilizado anti-fibrinogênio produzido em coelho na diluição 1:5000, anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase na diluição 1:10000 (*Sigma-Aldrich*), anti-biglicam (1:2000), anti-decorina (1:10000), anti-lumicam (1:3000) produzidos em cabra (*R&D*) e anti-IgG de cabra conjugado à peroxidase na diluição 1:10000 (*Sigma-Aldrich*).

3.5 OBTENÇÃO DE PLASMA HUMANO DEPLETADO DE ALBUMINA

O procedimento foi efetuado em *batch* utilizando o Affi-Gel® Blue (BioRad), um gel de agarose em formato de *beads*, ligado covalentemente ao corante Cibacron Blue, que é equivalente à resina Blue Sepharose CL-6B, a qual possui alta capacidade de ligação à albumina. Para a depleção de albumina, 1 mL de plasma humano foi adicionado à resina Affi-Gel® Blue (3 mL), previamente acondicionada em 2 mL de solução A (fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,1). A mistura foi incubada em gelo por aproximadamente 2 h sob agitação. Após este período, o sobrenadante foi coletado, sendo este composto por 3 mL de plasma depletado de albumina em solução A. Em seguida, efetuou-se a eluição das proteínas retidas na resina pela adição de 6 mL de solução B (fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,1, contendo 1,4 M de NaCl). A reconstituição da resina foi feita através de duas lavagens com 6 mL de solução C (fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,1, contendo 2,0 M de hidrocloreto de guanidina). As proteínas do plasma depletado de albumina e do eluato foram quantificadas pelo método de Bradford.

3.6 EXPRESSÃO, RENOVELAMENTO E PURIFICAÇÃO DA TERMOLISINA RECOMBINANTE

A termolisina NprT de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, codificada pelo gene LIC13322, possui sequência sinal para secreção, pró-domínios FTP e PepSY e domínios catalíticos Peptidase_M4 e Peptidase_M4_C (FIGURA 6). A etapa de clonagem do fragmento gênico contendo os domínios PepSY e os domínios catalíticos M4 já havia sido efetuada anteriormente pelo grupo (FRAGA et al., 2014). Neste projeto foram realizadas a

expressão e purificação da proteína correspondente. A linhagem *E. coli* BL21-SI competente foi transformada com a construção. Colônias isoladas foram inoculadas em 50 mL de meio LBON (meio LB sem NaCl) com ampicilina e incubadas a 30° C sob agitação por 18 h. O pré-inóculo foi adicionado a 500 mL de meio LBON com ampicilina, seguindo-se uma incubação a 30° C sob agitação até se atingir a DO_{600 nm} de 0,6. A expressão foi induzida pela adição de 300 mM NaCl por 3 h a 30° C. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada a 5057 x g por 15 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 30 mL de PBS. As bactérias foram em seguida lisadas através da passagem pelo *French Pressure Cell Press* (SLM Amico) e centrifugadas a 12857 x g por 15 min a 4° C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os corpúsculos de inclusão (fração insolúvel) foram ressuspensionados em tampão de solubilização (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, uréia 8M). Suspensões dos corpúsculos de inclusão contendo a proteína termolisina foram diluídas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo EDTA 1 mM e concentração final de arginina 0,4 M. As amostras foram então colocadas em sacos plásticos, seladas e submetidas a elevadas pressões hidrostáticas (2,4 kbar) em equipamento de pressurização R4-6-40, por 90 min. Seguiu-se descompressão a 0,4 kbar por 16 h e uma descompressão final até atingir a pressão atmosférica. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 min e o sobrenadante contendo a termolisina renovelada foi aplicado em coluna de exclusão molecular em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. A protease purificada foi coletada e mantida a -80°C até a realização dos testes funcionais.

vezes com PBS-T por 5 min entre cada uma das etapas anteriores e a revelação foi feita com SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate seguindo as instruções do fabricante.

3.7.2 Dosagem de proteína

A concentração total de proteínas dos sobrenadantes das leptospiros e da termolisina recombinante foi determinada pelo *Kit BCA Protein Assay* (Pierce).

3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DOS SECRETADOS DE LEPTOSPIRAS SOBRE COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR E DO PLASMA HUMANO

Alíquotas dos secretados de leptospiros foram incubadas com as seguintes proteínas purificadas: laminina (5 µg), fibronectina plasmática (5 µg), matrigel (15 µg), fibrinogênio (15 µg), plasminogênio (5 µg), trombina (1 µg), e as proteoglicanas biglicam (2µg), decorina (2 µg) e lumican (2 µg). As incubações foram realizadas a 37 °C, por 1, 4 e 18 h em PBS pH 7,4 ou por 5 h em PBS pH 7,4 no caso das proteoglicanas. Os produtos das clivagens foram analisados em géis de poliacrilamida corados por *Coomassie Blue* ou prata.

Plasma humano depletado de albumina também foi utilizado como fonte de fibrinogênio nos ensaios proteolíticos. Cinco microgramas de plasma depletado ou de fibrinogênio humano purificado foram incubados com o secretado de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (0,01 µg, 0,05 µg, 0,1 µg e 0,5 µg) por 4 h a 37 °C, em PBS pH 7,4. Os produtos de clivagem foram analisados por *Western blot* com anticorpos específicos anti-fibrinogênio.

3.9 IDENTIFICAÇÃO DAS CLASSES DE PROTEASES ENVOLVIDAS NAS CLIVAGENS DOS COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR E DO PLASMA HUMANO UTILIZANDO INIBIDORES DE PROTEASE

Nestes ensaios, o sobrenadante de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foi incubado com diferentes classes de inibidores de protease nas concentrações mencionadas na Tabela 2, por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os componentes de matriz extracelular ou do plasma humano. As reações foram incubadas por 5 h a 37° C. A inibição das clivagens foi analisada por SDS-PAGE após coloração por prata.

Tabela 1. Inibidores de protease utilizados nos ensaios de inibição.

Inibidor	Classe de protease	Concentração utilizada
PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo)	Serino proteases	5 mM
1,10-fenantrolina	Metaloproteases	5 mM
EDTA	Metaloproteases	10 mM
E-64	Cisteíno proteases	28 µM
Pepstatina	Aspártico proteases	5 µM

3.10 ANÁLISE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA PRESENTE NO SECRETADO DE LEPTOSPIRAS POR ZIMOGRÁFIA

A presença de atividade proteolítica das amostras também foi investigada por zimografia. Amostras de secretado de leptospiiras foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida 12% contendo colágeno tipo I (0,5 mg/mL) ou fibrinogênio (1 mg/mL). Após a eletroforese, os géis foram lavados com uma solução contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e 2,5 % de Triton X-100 por 30 min a temperatura ambiente e posteriormente incubados em uma solução contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, CaCl₂ 10 mM e 0,02 %

de Chaps a 37° C por 18 h. Por fim, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* (*Sigma-Aldrich*).

3.11 PREPARAÇÃO DO SECRETADO PARA ESPECTROMETRIA DE MASSAS PELO MÉTODO FASP (*Filter Aided Sample Preparation Method*)

A espectrometria de massas foi realizada pelo método FASP (*Filter Aided Sample Preparation Method*) descrito por Wiśniewski et al. (2009). Foram utilizados 30 µg dos sobrenadantes de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (patogênica) e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (saprófita). Filtros Microcon YM-10 MWCO (10 kDa, Millipore) foram utilizados para concentrar os sobrenadantes. Após esta etapa 30 µL dos sobrenadantes concentrados foram adicionados a 200 µL de UA (uréia 8M em Tris HCl 0,1 M pH 8,5) e centrifugou-se a 14.000 g por 15 min. Após centrifugação foram adicionados 200 µL de UA ao filtro e centrifugou-se novamente a 14.000 x g por 15 min. O *flow-through* do tubo coletor foi descartado e foram adicionados 100 µL de DTT (DTT 0,02M em UA). Incubou-se por 30 min e centrifugou-se a 14.000 x g por 10 min. Adicionaram-se 100 µL de solução de IAA (0,05M em UA), agitou-se rapidamente e incubou-se a temperatura ambiente por 30 min no escuro. Após esse período centrifugou-se a 14.000 x g por 10 min. Foram adicionados 100 µL de UA e centrifugou-se a 14.000 x g por 15 min (este passo foi repetido mais duas vezes). Foram adicionados 100 µL de solução ABC (NH₄HCO₃ 0,05M em água MilliQ) e centrifugou-se a 14.000 x g por 10 min (este passo foi repetido mais duas vezes). Foram adicionados 60 µL de solução ABC. Retirou-se uma alíquota equivalente a 2 µg de proteína (controle da digestão) e adicionou-se tripsina às proteínas presentes nas unidades de filtragem (proporção enzima:substrato 1:50 a 1:100). Agitou-se rapidamente e incubou-se a 37°C por 18 horas. Após esse período as unidades de filtragem foram transferidas para outro tubo coletor e centrifugou-se a 14.000 x g por 10 min. O *flow-through* foi coletado. Adicionaram-se 50 µL de solução ABC e centrifugou-se a 14.000 x g por 10 min. O *flow-through* foi coletado. Retirou-se outra alíquota equivalente a 2 µg após a digestão (controle da digestão). O eluato foi acidificado com 2 µL de ácido trifluoracético 10% (TFA 10%) até pH ≤ 3. As amostras de peptídeos resultantes do

processo de digestão tripsínica foram submetidas ao processo de dessalinização utilizando *Stop-and-go extraction tip (StageTip)* C-18, montados em ponteiros Tip p-200 (Axygen), de acordo com o método descrito por Rappsilber et al. (2007). As amostras foram secadas em *speed-vac* e congeladas a -80°C até a realização das análises.

3.12 ANÁLISE DOS PROTEOMAS POR LC-MS/MS

Para as análises por LC-MS/MS os peptídeos provenientes do processo de digestão tripsínica em solução dos sobrenadantes de cultura LPF e Patoc I foram analisados no espectrômetro LTQ ORBITRAP Velos (Thermo Scientific). Foram realizadas três réplicas biológicas de cada sobrenadante e três réplicas técnicas de cada réplica biológica, resultando em um número total de 18 análises (9 do sobrenadante da LPF e 9 da Patoc I). Cada mistura de peptídeos (alíquotas de 5 μL) foi automaticamente injetada em uma pré-coluna C-18 Jupiter de 5 cm (Phenomenex; 100 μm ID $\times$ 360 μm OD; sistema EOSY nanoLCII, Thermo Fisher Scientific) acoplada a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific). A separação cromatográfica dos peptídeos foi realizada em coluna de 10 cm de comprimento (75 μm , I.D. $\times$ 360 μm O.D.) C-18 Aqua® (Phenomenex). Os peptídeos foram eluídos com um gradiente linear de 5-35% de solução B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) durante 75 minutos sob o fluxo de 200 nL / min, 35-80% de solução B durante 15 min e 80% de solução B durante 7 min. Retornou-se a 5% por 1 min e 5% de solução B durante 22 min. A fonte de ionização por *electrospray* foi ajustada para o modo de operação positivo com voltagem de 2,4 kV. O intervalo de varredura de massas considerado foi de 300-1.700 m/z , (resolução de 60.000 em 400 m/z), operando no modo de aquisição dependente de dados (DDA) onde os doze íons mais intensos por *scan* foram selecionados para eventos de fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID) com energia de colisão normalizada de 35% e janela de isolamento de 3 m/z para íon precursor. O tempo de exclusão dinâmica utilizado foi 60 segundos.

3.13 BUSCA EM BANCOS DE DADOS E ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA DOS DADOS GERADOS

Os dados gerados pelo LTQ-Orbitrap Velos foram analisados com o algoritmo Andromeda (Cox et al., 2011) pelo software MaxQuant V 1.5.3.12 (Cox and Mann, 2008) e o banco de dados para o gênero *Leptospira* (UniProt - 30/11/2015). Os parâmetros utilizados para a busca em banco de dados foram: tolerância de erro de massa para o peptídeo precursor de 10 ppm; tolerância de erro de massa para os fragmentos de MS/MS de 0,5 Da; tolerância de duas clivagens perdidas pela enzima, e tamanho mínimo do peptídeo de sete aminoácidos; modificação fixa: carbamidometilação de resíduos de cisteínas; modificações variáveis: oxidação dos resíduos de metionina e a deaminação em resíduos de asparagina ou glutamina; taxa de falso positivo em nível de peptídeos e proteínas: 1%; um único peptídeo necessário para identificação de proteínas. Os resultados de identificação dos peptídeos gerados pelo software MaxQuant foram analisados pelas ferramentas bioinformáticas contidas no software Perseus (versão 1.5.0.15). As identificações obtidas a partir do banco de dados de contaminantes e do banco de dados *decoy* foram removidas. Como critério de identificação, foram consideradas as proteínas identificadas em duas das três réplicas biológicas. A FIGURA 7 resume de forma esquemática a abordagem proteômica realizada.

Figura 7 - Esquema ilustrativo do método de análise utilizado para realização do exoproteoma

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DOS SECRETADOS DE LEPTOSPIRAS SOBRE PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR E COMPONENTES DA CASCATA DE COAGULAÇÃO

As leptospiros foram cultivadas em meio EMJH modificado por sete dias a 29 °C para que se obtivesse quantidade de bactéria suficiente para os ensaios de secreção. Nestes ensaios, o meio de cultura EMJH foi substituído por PBS 1X pH 7,4 e as leptospiros foram incubadas a 37 °C para a secreção de proteínas. Estas condições foram selecionadas com o objetivo de simular o microambiente encontrado no hospedeiro, em relação à osmolaridade (300 mOsm), pH (7,4) e temperatura (37° C).

A degradação de proteínas solúveis e estruturais do hospedeiro contribui para a disseminação bacteriana, facilitando a invasão e a colonização de órgãos-alvo. Leptospiros patogênicas são capazes de cruzar barreiras teciduais e atingir a circulação de forma bastante rápida e eficiente. Os órgãos-alvo são colonizados mesmo antes que as bactérias se multipliquem (WUNDER et al., 2016). A rápida disseminação no hospedeiro decorre da forma espiralada associada à sua motilidade, que se assemelha ao movimento de um saca-rolhas, permitindo que essas bactérias se locomovam em meios viscosos com grande eficiência (PICARDEAU, 2017). Ainda, proteases secretadas durante os estágios iniciais da infecção também contribuem para os processos de invasão e evasão imune da bactéria (FRAGA et al., 2014).

Neste trabalho, avaliou-se a atividade proteolítica de proteínas secretadas por leptospiros sobre componentes da matriz extracelular e moléculas do plasma do hospedeiro. Nessa primeira etapa, foram utilizados sobrenadantes de cultura de duas espécies: uma patogênica virulenta (*L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm), referida nas Figuras como “LPF”, e uma espécie não-patogênica (*L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I), referida como “Patoc I”.

Membranas basais, predominantemente compostas por laminina e colágeno IV, são matrizes especializadas que separam o epitélio e o endotélio do tecido conjuntivo subjacente. Visto que a degradação dos componentes da membrana basal é crucial para a invasão, a atividade proteolítica dos sobrenadantes de cultura de leptospiros foi inicialmente

avaliada utilizando-se laminina e matrigel. Nas condições experimentais adotadas, os dois componentes não foram degradados por proteínas dos sobrenadantes bacterianos mesmo após tempos de incubação prolongados (18h) (FIGURA 8A). Proteoglicanas, proteínas altamente glicosiladas, são também componentes majoritários da matriz extracelular. Elas preenchem espaços na matriz estabelecendo pontes entre diversas macromoléculas. São elas que conferem um microambiente altamente hidratado e gelatinoso, característico da matriz extracelular encontrada em certos tecidos (CHAGNOT et al., 2012). A degradação de uma classe de proteoglicanas conhecida como SLRP (*small leucine-rich proteoglycans*) por proteases presentes nos sobrenadantes de cultura de leptospiros também foi avaliada. Curiosamente, decorina e biglicam foram quase totalmente degradadas após incubação com o sobrenadante da estirpe virulenta LPF (FIGURA 8A). Lumericam foi parcialmente suscetível à degradação (FIGURA 8A). Independentemente do substrato utilizado, não se observou atividade proteolítica na presença do secretado da estirpe saprófita Patoc I (FIGURA 8A).

Proteínas da cascata de coagulação como fibrinogênio, plasminogênio e trombina, bem como fibronectina plasmática, também foram avaliadas como substratos. Fibronectina plasmática e fibrinogênio foram degradados de maneira tempo-dependente por proteases da estirpe LPF (FIGURA 8B). Não se observou degradação de tais componentes na presença do sobrenadante da estirpe Patoc I, mesmo após longos períodos de incubação (18h). Fragmentos de fibronectina variando de 25 a 170 kDa foram gerados após 18h de incubação. Fragmentos menores de 25 a 45 kDa também foram produzidos em consequência da degradação das cadeias α e β do fibrinogênio (FIGURA 8B).

Outras proteínas do plasma como o plasminogênio e a trombina também foram avaliados, mas não sofreram proteólise na presença dos sobrenadantes de cultura das duas estirpes utilizadas (FIGURA 8B). Isso mostra que as proteases de leptospira possuem um certo grau de especificidade, não degradando, de forma promíscua, qualquer substrato que lhes seja ofertado. Ainda, vale ressaltar que é interessante para a bactéria que o plasminogênio permaneça íntegro. Conforme mencionado na Introdução, leptospiros patogênicos se ligam ao plasminogênio e este é convertido em sua forma ativa, a plasmina, na presença do ativador uPA. A plasmina gerada degrada uma série de substratos importantes para a invasão e evasão da bactéria (VIEIRA et al., 2009; WOLFF et al., 2013).

Figura 8 –Avaliação da atividade proteolítica dos secretados de leptospiros sobre componentes da matriz extracelular (A) ou do plasma humano (B)

Os sobrenadantes de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (patogênica) e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica) (0,5 µg cada) foram incubados com os componentes purificados pelos tempos indicados a 37 °C. As clivagens foram analisadas por SDS-PAGE. Os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie ou nitrato de prata. No caso do matrigel, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e coradas com Coomassie. Os produtos de clivagem da fibronectina plasmática e do fibrinogênio estão indicados por asteriscos (*). (M) Marcador de Peso Molecular Page Ruler (Pierce). Fonte: (SILVA, LB, 2017)

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio foi melhor caracterizada com a realização de ensaios adicionais. Primeiramente foram utilizadas diferentes quantidades dos

sobrenadantes da estirpe virulenta: 0,01 μ g, 0,05 μ g, 0,1 μ g e 0,5 μ g de proteína total do secretado para uma quantidade fixa de substrato: 15 μ g (FIGURA 9). A degradação da cadeia α começa a ocorrer quando se utiliza 0,05 μ g de proteína do secretado e a clivagem total tanto desta cadeia quanto da cadeia β completa-se com 0,5 μ g de proteína do secretado (FIGURA 9A). Para o estabelecimento do processo infeccioso, é importante que tais proteases clivem também estas proteínas presentes no plasma. Assim, novos ensaios proteolíticos foram efetuados utilizando plasma humano depletado de albumina como fonte de fibrinogênio, condição esta mais próxima da fisiológica (FIGURA 9B). O fibrinogênio presente no plasma humano foi degradado pelas proteases das leptospiros virulentas, confirmando os resultados obtidos com o fibrinogênio purificado.

Figura 9 – Avaliação da atividade proteolítica do secretado de *L. interrogans* Fromm sobre o fibrinogênio.

Os sobrenadantes da patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm e da saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I foram incubados com (A) fibrinogênio purificado e (B) plasma humano como fonte de fibrinogênio nas seguintes quantidades (2) 0,01 μ g; (3) 0,05 μ g; (4) 0,1 μ g; (5) 0,5 μ g de proteína total do secretado por 2 h a 37 °C. As clivagens com fibrinogênio purificado foram analisadas por SDS-PAGE em géis corados com nitrato de prata e com plasma humano foram analisadas por *Western blot* com anticorpo específico contra fibrinogênio. (1) Fibrinogênio purificado ou plasma humano. * produtos de degradação. Fonte: (SILVA, LB, 2017).

4.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA PRESENTE NO SECRETADO DE LEPTOSPIRAS POR ZIMOGRAFIA

Para avaliação da degradação de colágenos adotou-se a técnica de zimografia, por ser mais adequada para estes substratos. Em paralelo, foi também incluído o fibrinogênio. Para tanto, amostras de secretado de leptospiiras não patogênicas e patogênicas foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida contendo colágeno tipo I ou fibrinogênio. Os dados mostram que o secretado da não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc não apresentou atividade proteolítica. Contudo, duas proteínas de aproximadamente 100 e 50 kDa apresentaram atividade enzimática quando se utilizou o secretado da patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki no gel contendo colágeno I (FIGURA 10). Conforme anteriormente mencionado, uma gelatinase de 46 kDa foi descrita na membrana de sorovares patogênicos de *Leptospira* (MADATHIPARAMBIL et al., 2011). Ainda, uma collagenase de aproximadamente 97 kDa também foi relatada (KASSENE et al., 2014). Nossos dados sugerem que estirpes patogênicas virulentas secretam pelo menos duas collagenases com massas moleculares parecidas com aquelas descritas na literatura. Não se pode descartar a possibilidade de que sejam as mesmas collagenases já reportadas.

Para o fibrinogênio, duas outras proteases de aproximadamente 68 e 40 kDa foram identificadas (FIGURA 10). Esse é o primeiro relato de proteases com atividade fibrinogenolítica de leptospiiras. Portanto, pode-se concluir que proteases contidas exclusivamente nos secretados de leptospiiras patogênicas apresentam atividade sobre o colágeno tipo I e o fibrinogênio.

Figura 10 - Análise da atividade proteolítica presente no secretado de leptopiras por zimografia

Amostras dos secretados de leptopiras (0,5 µg) foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida 12% contendo (A) colágeno tipo I (0,5 mg/mL) ou (B) fibrinogênio (1 mg/mL). (1) proteínas secretadas pela *L. biflexa* sorovar Patoc (não patogênica), (2) proteínas secretadas pela *L. interrogans* sorovar Kennewicki (patogênica). Os géis foram corados com azul de Coomassie R-250. Fonte: (SILVA, LB, 2017).

4.3 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA POR INIBIDORES DE PROTEASES

Os dados indicam que a estirpe patogênica LPF é capaz de secretar proteases que clivam proteínas da matriz extracelular e da cascata de coagulação, tanto purificadas quanto presentes no plasma humano (fibrinogênio). Para determinar quais as classes de proteases presentes nos sobrenadantes de cultura responsáveis por estas clivagens, foram utilizados inibidores das quatro principais classes de proteases, sendo estes: PMSF (serino proteases), E-64 (cisteíno proteases), 1,10-fenantrolina (metaloproteases), EDTA (metaloproteases) e pepstatina (aspártico proteases). Nestes ensaios, os inibidores foram pré-incubados com o sobrenadante de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (LPF), sendo em seguida adicionadas as proteínas de matriz ou do plasma. Em todos os casos, apenas o inibidor de metaloproteases 1,10-fenantrolina foi capaz de abolir as clivagens das moléculas de matriz e da cascata de coagulação. Curiosamente, o EDTA não inibiu as degradações. Estes resultados sugerem fortemente o envolvimento de metaloproteases no processo de degradação desses substratos (FIGURA 11). Os demais inibidores utilizados não tiveram qualquer efeito sobre os substratos.

Figura 11 - Identificação das classes de proteases de *Leptospira* envolvidas na clivagem dos componentes da matriz extracelular e do plasma

O sobrenadante de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (0,5 µg) foi incubado com os seguintes inibidores: PMSF 5 mM (serino proteases), E-64 28 µM (cisteíno proteases), 1,10- fenantrolina 5 mM (metalo proteases), EDTA 10 mM (metalo protease) ou pepstatina 5 µM (aspártico proteases). Em seguida, adicionaram-se os componentes da matriz extracelular ou do plasma e as reações foram incubadas por 5 h a 37°C. A inibição das clivagens foi analisada por SDS-PAGE. Os géis foram corados por prata. Fonte: (SILVA, LB, 2017)

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE DIFERENTES SECRETADOS DE LEPTOSPIRAS ATENUADAS EM CULTURA FRENTE AOS COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR E DO PLASMA HUMANO

Para avaliar se estirpes patogênicas atenuadas em cultura também seriam capazes de secretar proteínas com atividade proteolítica, utilizou-se um painel de sete estirpes de *Leptospira*, incluindo uma virulenta (*L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm), duas saprófitas (*L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I e *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11) e quatro estirpes atenuadas em cultura (*L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 10A, *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, *L. kirshneri* sorovar Cynopteri estirpe 3522C e *L. noguchi* sorovar Panama CZ214). Curiosamente, a atividade proteolítica só foi observada na presença do sobrenadante da estirpe virulenta LPF (canaleta 2), indicando que a produção de proteases pode ser um importante determinante de virulência. Os sobrenadantes das estirpes atenuadas ou saprófitas não apresentaram atividade proteolítica significativa contra fibronectina, decorina ou fibrinogênio (FIGURA 12).

Estes mesmos sobrenadantes de *Leptospira* haviam sido previamente usados em um trabalho realizado pelo grupo (FRAGA et al. 2014). Diferentemente do que foi observado no presente estudo, no trabalho realizado por Fraga e colaboradores, houve clivagem de diversas moléculas do sistema complemento na presença dos sobrenadantes das estirpes atenuadas, sugerindo que as proteases responsáveis pela degradação de moléculas do complemento continuam a ser secretadas com a perda da virulência.

Figura 12 – Avaliação da atividade proteolítica de secretados de leptospiros virulentos, atenuados em cultura ou não-patogênicos frente aos componentes da matriz extracelular e do plasma

(A) Fibronectina Plasmática; (B) Decorina; (C) Fibrinogênio. Os sobrenadantes de (1) *L. biflexa* Patoc I; (2) *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (espécie patogênica virulenta); (3) *L. biflexa* sorovar Andamana (espécie não patogênica); (4) *L. interrogans* sorovar Copenhageni; (5) *L. interrogans* sorovar Pomona; (6) *L. kirshneri* sorovar Cynopteri (7) *L. noguchi* sorovar Panama foram incubados com fibronectina plasmática, decorina e fibrinogênio por 2 h a 37°C (fibrinogênio) ou 18 h a 37°C (decorina e fibronectina plasmática). As clivagens foram analisadas por SDS-PAGE. Os géis foram corados com nitrato de prata. Fonte: (SILVA, LB, 2017)

4.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TERMOLISINA RECOMBINANTE

Os ensaios de inibição proteolítica indicam que metaloproteases são responsáveis pelas clivagens das proteínas de matriz extracelular e do plasma observadas na presença dos sobrenadantes de leptospiros patogênicos. Considerando este dado, realizou-se uma busca nos genomas de *Leptospira* sequenciados para encontrar possíveis candidatos para esta função. Analisando comparativamente os genomas das espécies patogênicas e saprófitas, observou-se que grande parte dos genes que codificam proteases nas leptospiros patogênicas possui algum grau de identidade e/ou similaridade com genes presentes nas espécies saprófitas. De forma interessante, verificou-se que uma das poucas exceções eram as termolisinas, metaloproteases da família peptidase M4 (*MEROPS database*, RAWLINGS et al., 2012), cujos genes estão presentes apenas em estirpes patogênicas de *Leptospira* (PICARDEAU, 2017). Deste modo, a proteína codificada pelo gene LIC13322 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni foi selecionada para ser produzida na forma

recombinante para estudos de atividade proteolítica (FIGURA 13). Cabe lembrar que existem outras três termolisinas nesta espécie de *Leptospira*.

A produção da termolisina recombinante foi efetuada utilizando o sistema de expressão heterólogo em *Escherichia coli*. O protocolo de purificação foi otimizado e, finalmente, obteve-se a proteína recombinante funcional. Como estratégia, adotou-se um processo de solubilização e renaturação da proteína em uma só etapa, em condições de alta pressão hidrostática (colaboração com Dra. Lígia Morganti Ferreira Dias, IPEN). Nota-se que a proteína purificada encontra-se degradada, embora funcional (FIGURA 13, canaleta 2). Isso já era esperado, pois está bem descrito na literatura que metaloproteases de outras bactérias sofrem auto-catálise para se ativar (BITAR et al., 2007).

Figura 13 - Perfil eletroforético da termolisina recombinante purificada por pressurização

(1) Termolisina antes de ser submetida ao processo de purificação em coluna de exclusão molecular (2) Termolisina purificada por exclusão molecular em coluna TosoHass TKS analisada por SDS-PAGE (12%). (M) Marcador de Peso Molecular Page Ruler (Pierce). Fonte: (SILVA, LB, 2017)

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA TERMOLISINA RECOMBINANTE LIC13322 FRENTE A COMPONENTES DO HOSPEDEIRO

A termolisina recombinante foi incubada com os componentes fibrinogênio e as proteoglicanas: decorina, biglicam e lumicam, nas mesmas condições já descritas quando se utilizou o secretado total. Na FIGURA 14, são mostrados os resultados com fibrinogênio. Os produtos de clivagem foram analisados por *Western blot* com anti-fibrinogênio. Observa-se uma degradação dose-dependente do fibrinogênio na presença de quantidades crescentes de termolisina (FIGURA 14, canaletas 4 a 6). O anticorpo utilizado permite a detecção da cadeia α do fibrinogênio, que foi totalmente degradada na presença de secretado total (FIGURA 14, canaleta 2). A molécula permaneceu intacta na presença do secretado da estirpe Patoc I, usada como controle negativo (FIGURA 14, canaleta 3).

Figura 14 – Avaliação da atividade proteolítica da termolisina de *Leptospira* sobre o fibrinogênio

Os sobrenadantes da patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (2) e da saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (3) assim como a termolisina purificada 0,5 µg (4), 1µg (5) ou 2 µg (6) foram incubados com fibrinogênio por 4 h a 37 °C. As clivagens foram analisadas por *Western blot* com anticorpo específico contra fibrinogênio. (1) Fibrinogênio purificado. Fonte: (SILVA, LB, 2017).

Na FIGURA 15, são mostrados os resultados com as proteoglicanas. Os produtos de clivagem foram analisados por *Western blot* com anticorpos específicos para cada proteoglicana. Observa-se degradação de biglicam e decorina na presença de 2 µg de termolisina recombinante, no tempo máximo de incubação (24h). A eficiência de

degradação com o secretado total da LPF é indubitavelmente maior, já que se observa completo desaparecimento das moléculas no tempo máximo de incubação (FIGURA 15, canaleta 6). Lumicam não foi degradada pela termolisina recombinante. Os dados levam às seguintes hipóteses: há outras proteases secretadas que participam das degradações observadas e/ou a termolisina recombinante provavelmente não está completamente funcional. Em se tratando de uma enzima, a última hipótese é bem plausível dadas as dificuldades em se obter enzimas recombinantes com plena atividade. Análises de densitometria são apresentadas à direita (FIGURA 15).

Figura 15 – Avaliação da atividade proteolítica da termolisina de *Leptospira* sobre as proteoglicanas

A termolisina purificada (2 µg) e o sobrenadante da patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (0,5 µg), incluído como controle positivo, foram incubados com as proteoglicanas por 4 - 24 h (termolisina) ou 24 h (secretado) a 37 °C. As clivagens foram analisadas por *Western blot* com anticorpos específicos contra biglicam, decorina e lumicam. Análises de densitometria foram realizadas com o programa Alliance UVITEC. Fonte: (SILVA, LB, 2017)

4.7 ANÁLISE DO EXOPROTEOMA DE *L. INTERROGANS* FROMM E *L. BIFLEXA* PATOC I

Em paralelo às análises realizadas com a protease “candidata” termolisina, foram realizadas análises proteômicas com os sobrenadantes das estirpes virulenta e saprófita acima mencionadas para se ter uma ideia das proteases secretadas por essas bactérias e, eventualmente, abrir um leque de possibilidades de novos candidatos a serem estudados. As análises proteômicas foram realizadas em colaboração com o grupo da Dra. Solange Serrano do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – LETA – Instituto Butantan. Segundo o diagrama apresentado abaixo (FIGURA 16), foram identificadas 236 proteínas exclusivas da estirpe LPF (patogênica, virulenta) e 161 proteínas exclusivas da estirpe Patoc I (não-patogênica). Ambas possuem 50 proteínas comuns. As Tabelas contendo o conjunto de proteínas identificadas nas duas estirpes estão disponíveis no CD-ROM (Tabelas Suplementares). Na planilha 1, constam todas as proteínas identificadas nas duas espécies. Na planilha 2, constam as proteínas exclusivas da LPF; na planilha 3, constam as proteínas exclusivas da Patoc I e na planilha 4, constam as proteínas comuns. Análises preliminares dos dados proteômicos revelam a presença de algumas enzimas proteolíticas exclusivas da estirpe Fromm (TABELA 2). Merece destaque a protease “pappalysin-1 domain protein”. Trata-se de uma metaloprotease dependente de zinco, como a termolisina, apresentando o sítio ativo HEXXH. Nada se conhece a respeito das funções que esta protease possa exercer em bactérias. Uma análise criteriosa dos dados proteômicos está em andamento para que possamos selecionar mais alguns candidatos para análises posteriores. Curiosamente, não foram detectadas as termolisinas (há quatro genes codificando essa classe de proteínas no genoma) em nossas análises proteômicas. Dados anteriores do grupo indicam que essas proteínas são produzidas em quantidades ínfimas, sendo necessário concentrar o sobrenadante de forma drástica para que possam ser visualizadas em ensaios de *Western blot* (FRAGA et al., 2014). Ainda, há indícios de que os genes que codificam tais proteínas possam ser regulados por osmolaridade. Nesse caso, a concentração de sal no meio de cultivo das bactérias pode ser crucial para uma maior produção dessas metaloproteases. Novas análises proteômicas variando-se a osmolaridade do meio de cultivo bacteriano estão previstas para que se aborde essa questão.

É interessante notar a identificação de diversas proteínas consideradas *moonlighting* nos exoproteomas analisados. Proteínas *moonlighting* podem ser definidas como tendo múltiplas funções não relacionadas entre si. Normalmente, participam de processos metabólicos no citoplasma e desempenham funções diversas em outros compartimentos da célula. Embora não possuam peptídeo sinal para secreção, muitas vezes ancoram-se à membrana externa por mecanismos desconhecidos ou são liberadas no meio extracelular. No exoproteoma da estirpe Fromm as seguintes proteínas *moonlighting* foram identificadas: GroEL, Frutose-1,6-bifosfatase, peroxirredoxina, fator de elongação Tu, entre outras. O estudo das atividades *moonlighting* dessas proteínas vem sendo realizado por nosso grupo, dadas suas possíveis funções relacionadas à virulência. Uma gama de proteínas com estas características foi também encontrada em uma análise do exoproteoma de *Leptospira* realizada por outro grupo (ESHGHI et al., 2015).

Figura 16 – Diagrama de Venn

Número de proteínas identificadas

Foram identificadas 236 proteínas exclusivas da estirpe LPF (patogênica, virulenta) e 161 proteínas exclusivas da estirpe Patoc I (não-patogênica) e ambas possuem 50 proteínas comuns.

Tabela 2 –Proteases identificadas no exoproteoma

EMBL GenBank	Proteína	Gene	Classe
EMP06453.1	Papain Family cysteine protease	LEP1GSC124_0278	Cisteíno peptidase
M3CS93_	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	hslU	Peptidase
AAN49152.2	ATP-dependent Clp protease proteolytic	<i>clpP</i>	Serino endopeptidase
AAN49383.1	Predicted Zn-dependent protease	<i>tldD</i>	Metalopeptidase
AAN49656.2	Methionine aminopeptidase	<i>map</i>	Metaloaminopeptidase
EKO25673.1	Pappalysin-1 domain protein	LEP1GSC104_4629	Metalopeptidase
EMM80523.1	Pappalysin-1 domain protein	LEP1GSC037_2092	Metalopeptidase

5. CONCLUSÕES

- Neste estudo, a atividade proteolítica de proteínas secretadas por leptospiros sobre um painel de moléculas da matriz extracelular e do plasma foi avaliada. O sobrenadante de cultura da estirpe virulenta *L. interrogans* sorovar Kennewicki Fromm degradou fibrinogênio humano, fibronectina plasmática, colágeno Tipo I, e as proteoglicanas decorina, biglicam e lumican.
- Proteínas de aproximadamente 100 e 50 kDa secretadas pela estirpe virulenta Fromm apresentam atividade colagenolítica e proteínas de aproximadamente 68 e 40 kDa apresentam atividade fibrinogenolítica.
- Os sobrenadantes de estirpes saprófitas ou patogênicas atenuadas em cultura não apresentaram atividade proteolítica sobre componentes da matriz ou do plasma, fato que sugere que a produção de proteases deve ser um determinante de virulência importante, contribuindo para o processo de invasão da bactéria.
- Ensaio de inibição mostraram que enzimas da classe das metaloproteases estão envolvidas nas degradações das moléculas da matriz extracelular e do plasma humano.
- Uma busca nos genomas de leptospiros revelou quatro genes, presentes apenas nas espécies patogênicas, potencialmente codificando quatro termolisinas. Uma delas, codificada pela LIC13322, foi produzida na forma recombinante e apresentou atividade proteolítica sobre fibrinogênio, biglicam e decorina. Portanto, a atividade proteolítica observada no sobrenadante da estirpe Fromm pode, ao menos parcialmente, ser atribuída a esta metaloprotease.
- Análises comparativas dos exoproteomas das estirpes Fromm e Patoc I foram realizadas. Essas análises permitiram a identificação de 236 proteínas exclusivas da estirpe LPF, 161 proteínas exclusivas da estirpe Patoc I e 50 proteínas comuns a

ambas. Enzimas proteolíticas exclusivas da estirpe Fromm foram identificadas e representam potenciais alvos para futuras análises.

- A degradação de moléculas do tecido conjuntivo e de proteínas do plasma do hospedeiro por leptospiros deve certamente contribuir para a colonização e a destruição tecidual observada durante o processo de infecção.

6. REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, v. 27, p. 287-296, 2010.
- AMAMURA, T.A.; FRAGA, T.R.; VASCONCELOS, S.A.; BARBOSA, A.S.; ISAAC, L. Pathogenic *Leptospira* secreted proteases target the membrane attack complex: A potencial role for Thermolysin in Complement Inhibition. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 958, 2017.
- ARMSTRONG, P. B. Proteases and proteases inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. **Immunobiol.**, 211, 263-281, 2006.
- BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; SILVA, A. S.; DAHA, M. R.; ISAAC, L. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 1137-1143, 2009.
- BARBOSA, A. S.; MONARIS, D.; SILVA, L. B.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CIANCIARULLO, A. M.; ISAAC, L.; ABREU, P. A. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 3207-3216, 2010.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLING, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.**, v.3 p.757-771, 2003.
- BITAR, A.P.; CAO M.; MARQUIS, H. The Metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is active by Intramolecular Autocatalysis. **Journal of Bacteriol.**, v. 190, n. 1, p.107-111, 2007
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde : [recurso eletrônico] – 1. ed. atual. – Brasília : **Ministério da Saúde**, p. 621-641, 2016.
- CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; FRAGA, T. R.; SILVA, L. B.; MONARIS, D.; ABREU, P. A. E.; STROBEL, S.; JÓZSI, M.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S. Leptospiral immunoglobulin-like proteins Interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **J. Infect. Diseases.**, v. 205 p. 995-1004, 2012.
- CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L.; MØLLER, A. K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 2441-2450, 2007.

CHAGNOT, C.; LISTRAT, A.; ASTRUC, T.; DESVAUX, M. Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components. **Cell Microbiol.**, v. 14, n. 11, p.1687-96, 2012.

CONRAD, N.L.; MCBRIDE, F.W.C.; SOUZA, J.D.; SILVEIRA, M.M., FÉLIX, S.; MENDONÇA, K.S.; SANTOS, C.S.; ATHANAZIO, D.A.; MEDEIROS, M.A.; REIS, M.G.; DELLAGOSTIN, O.A., MCBRIDE, A.J.A. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 11, n. 3, p. 5441, 2017.

COSTA, F.; HAGAN, J.E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TORGERSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M.; STEIN, C.; ABELA-RIDDER, B.; KO, A.I. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 9, e. 3898, 2015.

COX, J AND MANN M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**. v. 26, p.1367-72, 2008.

COX, J.; NEUHAUSER, N.; MICHALSKI, A.; SCHELTEMA, R.A.; OLSEN, J.V.; MANN, M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. **J Proteome Res.**, v.10,n. 4, p.1794-805,2011.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWING, D. D.; FÉLIX, S. R.; DA SILVA, E. F.; MCBRIDE A. J. A. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines.**, v. 7 p. 1215-1224, 2011.

ESHGHI, A.; PAPPALARDO, E.; HESTER, S.; THOMAS, B.; PRETRE, G.; PICARDEAU, M. Pathogenic *Leptospira interrogans* exoproteins are primarily involved in heterotrophic processes. **Infect. Immun.**, v. 83, n. 8, p. 3061-73, 2015.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: MediSci., p. 353, 1999

FINN R. D.; MISTRY J.; TATE J.; COGGILL P.; HEGER A.; POLLINGTON J. E.; GAVIN O. L.; GUNASEKARAN P.; CERIC G.; FORSLUND K.; HOLM L.; SONNHAMMER E. L.; EDDY S. R.; BATEMAN A. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res.**, v.38, p. D211-22, 2010.

FRAGA, T. R.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scand. J. of Immun.**, v. 73, p. 408-419, 2011.

FRAGA, T.R.; CARVALHO, E.; ISAAC, L.; BARBOSA. A.S. *Leptospira* and Leptospirosis. In: Tang Y.W.; Sussama M.; Liu, D.; Schawartzaman (Eds). **Molecular Medical Microbiol.** 2 ed. London: Elsevier, v.3 p. 2145, 2014(a).

FRAGA, T.R.; COURROL, D.S.; CASTIBLANCO-VALENCIA, M.M.; HIRATA, I.Y.; VASCONCELLOS, S.A.; JULIANO, L.; BARBOSA, A.S.; ISAAC, L. Immune Evasion by Pathogenic *Leptospira* Strains: The Secretion of Proteases that Directly Cleave Complement Protein. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 6, p. 876-886, 2014.

FRAGA, T.R.; ISAAC, L.; BARBOSA, A.S. Complement Evasion by Pathogenic. **Front. Immunol.**, v. 7, p. 623, 2016.

JIN F.; MATSUSHITA O.; KATAYAMA S.; JIN S.; MATSUSHITA C.; MINAMI J., OKABE, A. Purification, characterization, and primary structure of *Clostridium perfringens* lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease. **Infect Immun.**, v. 64, p. 230-237, 1996.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptosira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, p. 736-747, 2009.

KASSEGNE, K.; HU, W.; OJCIUS, D.M.; SUN, D.; GE, Y.; ZHAO, J.; YANG, F.; LI, L.; YAN, J. Identification of collagenase as a critical virulence factor for invasiveness and transmission of pathogenic *Leptospira* species. **J. Infect Dis.** v. 209 p. 1105-1115, 2014.

KURAMITSU, H. K. Proteases of porphyromonas gingivalis; What don't they do?. **Oral Microbiol. Immunol.** v. 13, 263-270, 1998.

LETUNIC, I.; DOERKS T.; BORK P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. D302-5, 2012.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 14, p. 296-326, 2001.

LIN, Y.P.; GREENWOOD, A.; YAN, W.; NICHOLSON, L.K.; SHARMA, Y.; MCDONOUGH, S.P.; CHANG, Y.F. A novel fibronectin type III module binding motif identified on C-terminus of *Leptospira* immunoglobulin-like protein, LigB. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 6, n. 389, p. 57-62, 2009.

LIN, Y.P.; MCDONOUGH, S.P.; SHARMA, Y.; CHANG, Y.F. The Terminal Immunoglobulin-Like Repeats of LigA and LigB of *Leptospira* Enhance their binding to gelatin binding domain of fibronectin and host cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. e11301, 2010.

MADATHIPARAMBIL, M. G.; CATTAVARAYANE, S.; PERUMANA, S. R.; MANICKAM, G. D.; SEHGAL S. C. Presence of 46 kDa gelatinase on the outer membrane of *Leptospira*. **Curr Microbiol.**, v. 62, p. 1478-1482, 2011.

MCKERROW, J. H.; SUN, E.; ROSENTHAL, P. J.; BOUVIER, J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. **Annu Rev. Microbiol.**, v.47, p. 821-853, 1993.

MERI T.; MURGIA R.; STEFANEL P.; MERI S.; CINCO M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. **Microb Pathog.**, v. 39, 139-147, 2005.

NASCIMENTO, A.L.T.O.; 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.; ETUBAL, 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, Issue 4, p. 459-477, 2004.

PARK S. Y.; SHIN Y. P.; KIM C. H.; PARK H. J.; SEONG Y. S.; KIM B. S.; SEO S. J.; LEE I. H. Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. **Journal Immunol.**, v. 181, p. 6328-36, 2008.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis : still terra incognita ?. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.15, n.5, p.297-307, 2017.

RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using *StageTips*. **Nat Protoc.**, v.2, n.8, p.1896-906, 2007.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J.; BATEMAN, A. *MEROPS*: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. D343–D350, 2012

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

SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J. A.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J.G. R.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; MITERMAYER, G. R.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccines**, v. 25, p. 6277-6286, 2007.

SILVA, L. B.; MIRAGAIA, L. S.; BREDAS, L.C.; ABE, C.M.; SCHMIDT, M.C.; MORO, A. M.; MONARIS, D.; CONDE, J.N.; JÓZSI, M.; ISAAC L.; ABREU, P.A.; BARBOSA A.S. Pathogenic *Leptospira* species acquire factor H and vitronectin via the surface protein LcpA. **Infect. Immun.**, v.83 n.3, p. 888-897, 2015.

STEVENSON, B.; CHOY, H. A.; PINNE, M.; ROTONDI, M. L.; MILLER, M. C.; DEMOLL, E.; KRAICZY, P.; COOLEY, A. E.; CREAMER, T. P.; SUCHARD, M. A.; BRISSETTE, C. A.; VERMA, A.; HAAKE, D. A. *Leptospira interrogans* Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. **PLoS ONE**, v. 2, p.1188, 2007.

TOWBIN, H.; STALHELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: produce and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.76, n. 9,p. 4350-4, 1979.

VIEIRA M. L.; VASCONCELLOS S. A.; GONÇALES A.P.; MORAIS Z.M.; NASCIMENTO A. L.T.O. Plasminogen acquisition and activation at the surfasse of leptospira species lead to fibrinectin degradation. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 4092-101, 2009.

VIEIRA M. L.;ATZINGEN M. V.; OLIVEIRA T. R.; OLIVEIRA R.; ANDRADE D. M.; VASCONCELLOS S. A.; NASCIMENTO A. L. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*.**PLoS One.**, 5, 11259, 2010.

WANG, Z.; JIN, L.; WERGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microb. Cell Fact.**, v. 6, p. 39, 2007.

WIŚNIEWSKI JR, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, MANN M. Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nat Methods.**;v. 6, n.5, p.:359-62, 2009

WOLFF, D.G.; CASTIBLANCO-VALENCIA, M.M.; ABE, C.M.; MONARIS, D.; MORAIS, Z.M.; SOUZA, G.O.; VASCONCELLOS, S.A.; ISAAC, L.; ABREU, P.A.; BARBOSA, A.S. Interaction of *Leptospira* elongation factor Tu with plasminogen and complement factor H: a metabolic leptospiral protein with moonlighting activities. **PLoS One**, v. 27; n. 8, p. 81818, 2013.

WUNDER, E.A.; FIGUEIRA, C.P.; SANTOS, G.R.; LOURDAULT, K.; MATTHIAS, M.A.; VINETZ, J.M.; RAMOS, E.; HAAKE, D.A.; PICARDEAU, M.; DOS REIS, M.G.; KO, A.I. Real-Time PCR Reveals Rapid Dissemination of *Leptospira interrogans* after Intraperitoneal and Conjunctival Inoculation of Hamsters. **Infect Immun.**, v.23 n.84 p.2105-15, 2015.

YU, N.Y.; WAGNER, J.R.; LAIRD, M.R.; MELLIG.; REY, S.; LO, R.; DAO, P.; SAHINALP, S.C.; ESTER, M.; FOSTER, L.J.; BRINKMAN, F.S. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**, v.26, n. 13, p. 1608-15, 2010.

7. LISTA DE ANEXOS (EM CD-ROM)

7.1. TABELAS SUPLEMENTARES

Planilha 1 – Lista de proteínas identificadas nos exoproteomas.

Planilha 2 – Lista de proteínas exclusivas da LPF.

Planilha 3 – Lista de proteínas exclusivas da Patoc.

Planilha 4 – Lista de proteínas comuns.