LUIS GUILHERME VIRGÍLIO FERNANDES

Caracterização da interação de *Leptospira interrogans* com o sistema protrombina/trombina e possíveis implicações na virulência

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

São Paulo
2017

LUIS GUILHERME VIRGÍLIO FERNANDES

**Caracterização da interação de *Leptospira interrogans*
com o sistema protrombina/trombina e possíveis
implicações na virulência**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Ana Lúcia Tabet Oller do
Nascimento

Versão corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na Biblioteca do
ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Virgílio Fernandes, Luis Guilherme
Caracterização da interação de Leptospira
interrogans com o sistema protrombina/trombina e
possíveis implicações na virulência / Luis Guilherme
Virgílio Fernandes; orientadora Ana Lúcia Tabet
Oller do Nascimento. -- São Paulo, 2017.
169 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Leptospira. 2. Leptospirose. 3. Hemorragia.
4. Coagulação. 5. Disseminação. I. Tabet Oller do
Nascimento, Ana Lúcia , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Luis Guilherme Virgílio Fernandes

Título da Tese: Caracterização da interação de *Leptospira interrogans* com o sistema protrombina/trombina e possíveis implicações na virulência

Orientador(a): Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Caracterização da interação de *Leptospira interrogans* com o sistema protrombina/trombina e possíveis implicações na virulência", **protocolo nº 1025/13**, sob a responsabilidade de Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento e Luis Guilherme Virgilio Fernandes – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 8/5/2013.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
05/2013 - 03/2016 Laboratório de Biotecnologia Molecular II	175 camundongos Balb/c 18 a 22g (F); 80 hamsters Golden recém-desmamados 60 a 80g (M)

São Paulo, 10 de maio de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep @icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO - CEP SH

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **661/14**, referente ao projeto intitulado: "*Caracterização da interação de Leptospira interrogans com o sistema protrombina/trombina e possíveis implicações na virulência*" sob a responsabilidade de **Luis Guilherme Virgilio Fernandes**, foi analisado na presente data pela CEP SH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por esta Comissão.

São Paulo, 29 de abril de 2014.

Prof. Dr. **PAOLO M.A. ZANOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

A toda minha família amada, que sempre me
apoiou em todos os momentos da minha
vida.

Aos meus amigos queridos, que sempre
foram um refúgio para mim.

Dedico todas as palavras e todos os *pixels*
desta tese.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento, que é uma grande inspiração para mim, por sempre estar disposta a me ajudar e me escutar, pela orientação, pela confiança depositada em meu trabalho e por sempre estar aberta à discussão de novas ideias. Seu amor pela ciência me motiva todos os dias.

A todos os meus amigos do Laboratório de Biotecnologia Molecular II, Leandro, Mônica, Brenda, Roberta, Felipe 1, Felipe 2, Amanda, Maria Fernanda, Priscila, Jadson, Lucas, Gabi, Jupciana.

Em especial à Aline, uma grande amiga, cúmplice, que faz meus dias no laboratório mais divertidos, sempre disposta a discutir experimentos e novas ideias, me ajudando a pensar em estratégias mirabolantes para a descoberta da famigerada vacina contra leptospirose.

Ao professor Dr. Silvio A. Vasconcellos, Marcos B. Heinemann, Gisele O. Souza, Zenaide M. de Moraes e Antônio S. Filho do Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, pela colaboração nos experimentos de imunoproteção e por ceder tão prontamente as culturas de leptospirosas.

À professora Dra. Eliete C. Romero do Instituto Adolfo Lutz pelos soros cedidos.

À Miryam Paola Alvarez Flores por ter me ajudado bastante no início deste trabalho e por ter muitas vezes tirado minhas dúvidas quanto às reações de coagulação.

Aos amigos incríveis que conheci durante meu estágio em Paris, Diogo, Roberto, Aline, Marcela, Priscila, Leônidas, Marco, Élide e César, Luiza, Thabata, Douglas, Eduardo, e tantos outros residentes da Maison du Brésil. Vocês se tornaram tão especiais em pouco tempo.

Aos meus Biotecamigos, Fabiano, Dérick, Fernanda, Daniel, Priscila, Rodolfo, Cárol, Cleiton, Camila e Augusto. Obrigado por sempre estarem presentes e fazerem a minha vida mais divertida.

Aos amigos de longa data, Helga, Leo e Paula.

Au Dr. Mathieu Picardeau qui m'a reçu de bras ouverts dans son laboratoire de biologie des spirochètes à l'Institut Pasteur cette année. Je vous remercie beaucoup pour votre très chaleureux accueil, nos réflexions autour des nouvelles idées ont été vraiment très importantes pour moi. Avec son expérience et l'immense connaissance de la génétique de *Leptospira*, je suis sûr que le travail a gagné contours très intéressants.

À Mme. Sylvie Murguet, secrétaire du Dr. Picardeau, ce qui m'a beaucoup aidé avec le processus bureaucratique pour demander la bourse d'études et pour m'a acceptance à l'Institut Pasteur. Sans sa aide, mon stage de recherche à Paris ne serait pas possible.

Aux amis de Biologie des Spirochètes: Olivier, Crispin, Bobby, Nadia, Nathalie Guillaume, Ruben, Farida et Pascale. Je vous remercie de me accueillir si bien dans le laboratoire et de me faire sentir chez moi.

A todos os funcionários do Instituto Butantan, que trabalham de forma excelente na manutenção dos laboratórios.

A todos meus familiares, os quais amo incondicionalmente, minhas tias Josi, Paula e Dulcinéa, meu tio Tadeu, Deco e sua esposa Mariana, meus avós Ida e Joaquim, Darci e Luiz (*in memorian*) meu pai Sérgio e sua esposa Maria Alice, minha irmã Ana Clara, minha primas Talita e Tainara e meu primo e afilhado João Pedro.

E em especial à minha mãe, Isa, por sempre me apoiar e vibrar pelas minhas conquistas, até mais do que eu mesmo vibro.

Aos meus filhos caninos, Sirius (*in memorian*) e Kovu.

Aos meus professores da Universidade Federal de São Carlos.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia e a todos os professores que contribuíram na minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Butantan.

Obrigado!

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Doutorado (Processo 2012/24164-0), Doutorado-BEPE (Processo 2016/07680-5) e financiamento do projeto de pesquisa.

Obrigado!

No more running, no more hiding
No more hurting, no more crying
No more trouble, no more sighing
No more falling, no more striving
No more heartache, no more fighting

No more fear

Only flying

Lifhouse

RESUMO

FERNANDES, L. G. V. **Caracterização da interação de *Leptospira interrogans* com o sistema protrombina/trombina e possíveis implicações na virulência.** 2017. 169 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A leptospirose, causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, é uma zoonose de distribuição mundial, podendo causar um amplo espectro de manifestações clínicas em humanos. Nos casos mais severos da doença, observam-se icterícia, falência múltipla de órgãos e, sobretudo hemorragia, especialmente no quadro de Síndrome Pulmonar Hemorrágica, na qual se observa intenso dano pulmonar. Porém, os mecanismos subjacentes ao aparecimento de focos hemorrágicos durante a leptospirose severa ainda são pouco compreendidos. O sistema de coagulação é composto por diferentes proteínas que, por meio de reações sequenciais de proteólise, transformam o zimógeno protrombina na enzima multifuncional trombina, responsável pela conversão do fibrinogênio solúvel à fibrina insolúvel no sítio de lesão endotelial, impedindo, desta maneira, o sangramento excessivo e também a disseminação de patógenos para outros tecidos. O presente trabalho mostra que as leptospirosas virulentas são bastante eficientes em sequestrar a trombina humana via exossítio I, o que acarreta em uma redução drástica da atividade da enzima frente seu substrato natural fibrinogênio e consequentemente em uma menor formação de coágulo de fibrina, podendo favorecer a disseminação do patógeno e o aparecimento de hemorragia inicial, podendo constituir um novo mecanismo de virulência. Algumas proteínas recombinantes mostraram ligação à trombina, porém não foram capazes de reduzir significativamente sua atividade. Nossos resultados apontam que o principal efeito das leptospirosas sobre o sistema de coagulação possa ser indireto: a resposta imune inflamatória do hospedeiro pode causar uma ativação desenfreada da coagulação, o que sabidamente causa intensa hemorragia e falência múltipla de órgãos. Soros de pacientes acometidos pela leptospirose apresentam uma redução dos níveis séricos de protrombina e antitrombina, ambos indicadores de um quadro de coagulação ativada. Quando hamsters foram inoculados com cepas distintas de leptospirosas virulentas, apenas os animais que apresentaram sintomas hemorrágicos apresentaram também uma redução de protrombina e antitrombina. O fato das leptospirosas não serem capazes de interagir e/ou degradar a protrombina e a antitrombina reforça o efeito indireto das bactérias. A administração de anti-inflamatório nos animais desafiados com cepas virulentas de leptospirosas acarretou em uma melhor manutenção dos níveis de antitrombina e protrombina, o que também refletiu no aparecimento das manifestações hemorrágicas e na sobrevivência dos animais. Essa melhora nos parâmetros coagulatórios está relacionada à melhor manutenção dos níveis de fator tissular, sugerindo que a inflamação do hospedeiro contra as leptospirosas induz uma ativação da coagulação via expressão de fator tissular.

Palavras-chave: *Leptospira*. Leptospirose. Hemorragia. Coagulação. Disseminação.

ABSTRACT

FERNANDES, L. G. V. **Characterization of the interaction of *Leptospira interrogans* with prothrombin/thrombin system and possible implications in virulence.** 2017. 169 p. Ph. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Leptospirosis, caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*, is a widespread zoonosis with a diverse range of clinical manifestations in humans. During the severe form of the disease, jaundice, multiple organ failure and hemorrhage are observed, the latter more frequently in the Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, in which intense damage in lungs are observed. However, the mechanisms behind the hemorrhagic symptoms during severe leptospirosis are yet poorly understood. The coagulation system is composed of different proteins that, through sequential proteolysis reactions, transform the zymogen prothrombin into the multifunctional enzyme thrombin, responsible for the conversion of soluble fibrinogen to insoluble fibrin at the site of endothelial injury, thus preventing bleeding and the spread of pathogens to other tissues. The present work shows that virulent leptospires are very efficient in sequestering human thrombin via exosite I, which leads to a drastic reduction of the enzyme activity upon its natural substrate, fibrinogen, and consequently to less fibrin clot formation, which may favor the dissemination of the pathogen and bleeding. Some recombinant proteins showed thrombin binding activity but were not able to significantly reduce its activity. Our results indicate that the main effect of leptospires on the coagulation system may be indirect: the host inflammatory immune response can cause an uncontrolled activation of coagulation, which is known to cause intense hemorrhage and multiple organ failure. Sera from patients with leptospirosis present a reduction in serum levels of prothrombin and antithrombin, both indicators of activated coagulation. When hamsters were inoculated with distinct strains of virulent leptospires, only the animals that presented hemorrhagic symptoms showed a reduction of prothrombin and antithrombin. The fact that leptospires are not capable of interacting and/or degrading prothrombin and antithrombin highlights the indirect effect of bacteria. The administration of anti-inflammatory in animals challenged with virulent strains of *Leptospira* led to better maintenance of antithrombin and prothrombin levels, which also reflected in the appearance of hemorrhagic manifestations and the survival of animals. This improvement in coagulation parameters is related to the maintenance of tissue factor levels, suggesting that host inflammation against leptospires induces an activation of coagulation via tissue factor expression.

Keywords: *Leptospira*. Leptospirosis. Hemorrhage. Coagulation. Dissemination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Morfologia de <i>Leptospira</i> spp.....	23
Figura 2- Modelo esquemático da arquitetura de membrana de <i>Leptospira</i> spp.	25
Figura 3- Ciclo de transmissão da leptospirose	28
Figura 4- Incidência e mortalidade associada à leptospirose no Brasil.....	29
Figura 5- Representação da clivagem de protrombina em trombina.....	39
Figura 6- Reações do sistema de coagulação.....	41
Figura 7- Mapa do vetor de clonagem pGEM-T easy.....	54
Figura 8- Mapa do vetor de expressão pAE.....	55
Figura 9- Plasmídeo pMaOri.....	70
Figura 10- Avaliação da ligação de diferentes cepas de <i>Leptospira</i> à protrombina humana	74
Figura 11- Avaliação da ligação de diferentes cepas de <i>Leptospira</i> à protrombina por <i>western blotting</i>	75
Figura 12- Leptospiras virulentas são incapazes de bloquear a ativação de protrombina em trombina	76
Figura 13- Avaliação da ligação de diferentes cepas de <i>Leptospira</i> à trombina humana	77
Figura 14- Western blotting da interação entre as leptospiros e trombina humana	78
Figura 15- Avaliação da ligação das leptospiros à trombina por citometria de fluxo.....	79
Figura 16- Caracterização da ligação de leptospiros virulentas à trombina humana	80
Figura 17- Determinação dos sítios de interação na molécula de trombina	82
Figura 18- Soro de pacientes com leptospirose não apresenta complexos trombina-proteína.....	83
Figura 19- Cinética enzimática da clivagem da formação do coágulo de fibrina catalisada pela trombina	84
Figura 20- Inibição da atividade da trombina na formação do coágulo de fibrina por diferentes cepas de <i>Leptospira</i> spp.	85

Figura 21- <i>Leptospiras</i> virulentas apresentam uma atividade proteolítica cálcio-dependente sobre a trombina	88
Figura 22- Íons cálcio favorecem o efeito inibitório das leptospiras sobre a atividade da enzima trombina	90
Figura 23- <i>Leptospiras</i> recobertas com plasmina não degradam protrombina e trombina	92
Figura 24- Identificação de bandas reativas com trombina em extrato proteico de <i>L. interrogans</i>	93
Figura 25- Teste de efetividade dos agentes <i>crosslinkers</i> sobre a trombina	94
Figura 26- Análise da clonagem dos genes LIC10829 e LIC11051 em gel de agarose 1%	95
Figura 27- Análise da expressão das proteínas recombinante por SDS-PAGE.....	95
Figura 28- <i>Screening</i> de ligantes de trombina	97
Figura 29- Influência do exosítio I e sítio catalítico na interação entre as proteínas recombinantes e a trombina	98
Figura 30- Efeito das proteínas recombinantes sobre atividade da trombina frente o fibrinogênio	99
Figura 31- Avaliação da redução da atividade da trombina humana incubada com diferentes proteínas recombinantes	100
Figura 32- Análise da amplificação do gene LIC11360 contendo diferentes promotores	102
Figura 33- Análise da reação com enzimas de restrição para confirmar a presença dos insertos no vetor pMaOri.....	103
Figura 34- Validação da transcrição do gene LIC11360 por RT-PCR	104
Figura 35- Avaliação dos níveis transcricionais de LIC11360 sob diferentes promotores	104
Figura 36- Efeito de <i>L. biflexa</i> expressando Lsa23 sobre a atividade da trombina.....	106
Figura 37- Efeito de soros de pacientes com leptospirose sobre a atividade da trombina exógena	107
Figura 38- Comparação do efeito inibitório individual de soros de pacientes na fase inicial e convalescente da leptospirose sobre a trombina exógena	108

Figura 39- Redução dos níveis de antitrombina em pacientes com leptospirose.....	110
Figura 40- Avaliação da ligação de leptospiros à antitrombina.....	111
Figura 41- Avaliação do potencial proteolítico das leptospiros sobre a antitrombina...	112
Figura 42- Menores níveis de protrombina em soro humano estão relacionados com uma ativação <i>in vivo</i> da protrombina.....	114
Figura 43- Correlação entre os níveis de protrombina e inibidores de trombina em amostras de soro.	116
Figura 44- Quantificação dos níveis de PAI-1 em soro de pacientes com leptospirose..	117
Figura 45- Hemorragia durante a infecção por <i>Leptospira</i> em hamster é fortemente relacionada à redução de protrombina e de inibidores de trombina no soro	119
Figura 46- Avaliação do potencial mitogênico de diferentes cepas de <i>Leptospira</i> sobre esplenócitos murinos	122
Figura 47- Indução da secreção de TNF- α por esplenócitos murinos em contato com <i>Leptospira</i>	124
Figura 48- Efeito da imunização com bacterina heteróloga na sobrevivência de hamsters desafiados	125
Figura 49- Efeito da administração de dexametasona no tempo de sobrevivência dos animais	128
Figura 50- Manifestações hemorrágicas em pulmões de hamsters infectados.....	128
Figura 51- Dexametasona evita a redução exacerbada dos níveis de inibidores de trombina após infecção com leptospiros.....	131
Figura 52- Efeito do anti-inflamatório sobre os níveis de protrombina após infecção ..	132
Figura 53- A infecção por <i>Leptospira</i> spp. induz um aumento de FT em soro de hamsters	133
Figura 54- Representação esquemática dos efeitos diretos das leptospiros no sistema de coagulação	137
Figura 55- Representação esquemática dos efeitos indiretos das leptospiros no sistema de coagulação	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados para construção de mutantes.....	69
Tabela 2- Avaliação macroscópica em animais infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola cepa LO4	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amp	Ampicilina
BSA	Albumina de soro bovino
C4bp	C4 <i>binding protein</i> (proteína ligante de C4)
cDNA	DNA complementar
ConA	Concanavalina A
Da	Dalton
ddNTP	2', 3'didesoxirribonucleotídeo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMJH	Meio de cultura Ellinghausen–McCullough/Johnson–Harris
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
His	Histidina
Ig	Imunoglobulina
IPTG	Isopropil β -tiogalactosídeo
Kb	Kilobase
LAMP	Amplificação isotérmica
LB	Meio Luria-Bertani contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% triptona e 1% NaCl
LPHS	Síndrome pulmonar hemorrágica associada à leptospirose
LPS	Lipopolissacarídeo
MAT	Teste de microaglutinação
OPD	o-fenilenodiamina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
PAI-1	Inibidor de ativador de plasminogênio tipo 1
Pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	PBS contendo 0,05% Tween-20
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)

PMSF	Fenilmetilsulfonilfluor
RBS	Sítio de ligação ao ribossomo
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _r	RNA ribossômico
RT	Transcriptase reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TA	Temperatura de anelamento
TAE	Tris-acetado EDTA
TF	Fator Tissular
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
tPa	Ativador de plasminogênio do tipo tecidual
uPa	Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
X-gal	5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosideo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Microbiologia e biologia celular de <i>Leptospira</i> spp.	23
1.2 Leptospirose: epidemiologia e sintomas	27
1.3 Diagnóstico e tratamento	32
1.4 Mecanismos de patogenicidade descritos	34
1.5 Sistema de coagulação	37
2 OBJETIVOS	43
2.1 Objetivos gerais	43
2.2 Objetivos específicos.....	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 Cepas de Bactérias e soros utilizados.....	44
3.2 Teste de Microaglutinação (MAT).....	45
3.3 Componentes biológicos e macromoléculas	45
3.4 Interação em fase solúvel das leptospiros com protrombina e trombina.....	46
3.5 <i>Western blotting</i> para detecção da ligação das cepas de <i>Leptospira</i> à protrombina e trombina	46
3.6 Avaliação da ligação das cepas de <i>Leptospira</i> à trombina por citometria de fluxo	47
3.7 Bloqueio da conversão de protrombina em trombina.....	47
3.8 Caracterização da ligação de leptospiros virulentas à trombina	48
3.9 Detecção de complexos trombina-proteína em soro de pacientes diagnosticados com leptospirose.....	49
3.10 Avaliação da degradação de protrombina e trombina pelas leptospiros	49
3.11 Avaliação do efeito de leptospiros recobertas com plasmina sobre as moléculas de protrombina e trombina	50
3.12 Avaliação da formação do coágulo de fibrina em diferentes concentrações de trombina	50
3.13 Avaliação da inibição da atividade da trombina na formação do coágulo de fibrina pelas leptospiros.....	50
3.14 Identificação de bandas reativas com trombina no extrato de leptospiros virulentas	51
3.15 Avaliação do efeito de diferentes agentes de <i>crosslink</i> sobre a trombina.....	51
3.16 Identificação <i>in silico</i> de possíveis receptores de trombina	52
3.17 Clonagem dos genes LIC10829 e LIC11051.....	52

3.17.1 Amplificação dos genes de interesse	52
3.17.2 Clonagem no vetor pGEM-T Easy	53
3.17.3 Subclonagem no vetor de expressão pAE	55
3.17.4 Sequenciamento dos clones	56
3. 18 Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	57
3.18.1 Estudo de indução das proteínas recombinantes	57
3.18.2 Ensaio de Western blotting para confirmação da expressão das proteína recombinantes	57
3.18.3 Purificação e diálise das proteínas recombinantes	58
3.19 Screening de adesão de proteínas recombinantes com trombina.....	58
3.20 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes à trombina	59
3.21 Efeito da incubação dos ligantes de trombina na atividade da mesma	59
3.22 Efeito da incubação da trombina com soro de pacientes na geração do coágulo de fibrina	60
3.23 Detecção de antitrombina em soro de pacientes	60
3.24 Avaliação da interação das leptospiros com antitrombina	60
3.24 Influência de íons cálcio sobre a interação das leptospiros com antitrombina.....	61
3.25 Efeito da plasmina ligada às leptospiros sobre antitrombina	61
3.26 Avaliação da atividade inibitória de soro de hamsters infectados com <i>Leptospira</i> sobre a atividade da trombina.....	61
3.27 Detecção de protrombina em soro de pacientes e hamsters infectados.....	62
3.28 Quantificação de PAI-1 em soro de pacientes com leptospirose	62
3.29 Inativação das leptospiros por paraformaldeído.....	63
3.30 Avaliação da inflamação desencadeada por diferentes cepas de <i>Leptospira</i> spp. em esplenócitos murinos	63
3.31 Preparo de bacterinas para imunização em hamsters	65
3.32 Avaliação do efeito da inflamação por cepas de <i>Leptospira</i> spp. sobre a sobrevivência de hamsters após desafio heterólogo.....	65
3.33 Efeito da administração de anti-inflamatório corticoide sobre a sobrevivência e sintomatologia de hamsters desafiados com cepa virulenta de <i>Leptospira</i>	65
3.34 Detecção de Fator Tissular em amostras de hamsters infectados.....	66
3.35 Geração de <i>L. biflexa</i> recombinante expressando LIC11360 (Lsa23)	66
3.35.1 Determinação do sítio de início de transcrição no gene <i>lipL32</i> por 5'RACE	66
3.35.1.1 Extração de RNA	67
3.35.1.2 Síntese de cDNA com oligonucleotídeo específico para <i>lipL32</i>	67

3.35.1.3 Adição de cauda homopolimérica, PCR e sequenciamento.....	68
3.35.2 Amplificação e clonagem do gene LIC11360 (Lsa23) contendo promotor intrínseco e promotor do gene lipL32.....	68
3.35.3 Subclonagem no <i>suttle</i> vector <i>E. coli</i> / <i>L. biflexa</i> pMaOri	69
3.35.4 Conjugação entre <i>E. coli</i> recombinante e <i>L. biflexa</i>	70
3.35.5 Validação da expressão do gene de interesse por RT-PCR e qPCR	71
3.36 Avaliação da redução da atividade da trombina causado pelo mutante de <i>L. biflexa</i> expressando a proteína Lsa23	72
3.37 Análises estatísticas	72
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1 <i>Leptospira</i> spp. se ligam fracamente à protrombina e não impedem sua ativação mediada por Fator Xa	73
4.2 <i>Leptospiras</i> virulentas se ligam eficientemente à trombina	76
4.3 Soros de pacientes com leptospirose não apresentam níveis detectáveis de complexos proteína-trombina	82
4.4 <i>Leptospiras</i> são capazes de bloquear a atividade da trombina humana e reduzir a formação do coágulo de fibrina.....	83
4.5 <i>Leptospiras</i> virulentas promovem uma degradação de trombina dependente de cálcio	87
4.6 <i>Leptospiras</i> recobertas por PLA são incapazes de degradar protrombina e trombina	91
4.7 Identificação de receptores de trombina em extrato de <i>Leptospira</i>	92
4.8 Avaliação do efeito de agentes de <i>crosslink</i> na molécula de trombina.....	93
4.9 Identificação, clonagem e expressão de possíveis ligantes de trombina	94
4.10 <i>Screening</i> de ligação das proteínas recombinantes à trombina humana.....	96
4.11 Caracterização da especificidade de ligação entre as proteínas recombinantes e trombina humana e bloqueio da formação do coágulo de fibrina	97
4.12 Expressão heteróloga da proteína referente ao gene LIC11360 (Lsa23) na cepa saprofítica <i>L. biflexa</i> e sua caracterização funcional.....	100
4.12.1 Determinação do sítio de início de transcrição para o gene lipL32 em <i>L. interrogans</i>	100
4.12.2 Clonagem do gene LIC11360 controlado por diferentes promotores no vetor de expressão em <i>Leptospira</i> spp.	101
4.12.3 Avaliação do efeito da expressão heteróloga da proteína Lsa23 sobre a atividade da trombina	105

4.13 Soros de pacientes com leptospirose apresentam menor nível de inibição sobre trombina exógena	106
4.14 Diferentes cepas de <i>Leptospira</i> são incapazes de se ligar à antitrombina.....	111
4.15 Leptospiras virulentas são pouco eficientes na degradação da antitrombina	111
4.16 Menores níveis de protrombina durante a leptospirose podem estar relacionados ao quadro hemorrágico	113
4.17 Correlação entre os níveis de protrombina e inibidores de trombina em soro de pacientes com leptospirose.....	115
4.18 Detecção de PAI-1 em soro de pacientes com leptospirose.....	116
4.19 Manifestações hemorrágicas em hamsters infectados com diferentes cepas de <i>Leptospira</i> estão relacionadas a um decréscimo de fatores de coagulação	118
4.20 Avaliação do papel da inflamação sobre o aparecimento de quadros hemorrágicos	121
4.20.1 Avaliação do perfil mitogênico e inflamatório de diferentes cepas de <i>Leptospira</i> spp. em esplenócitos murinos	121
4.20.2 Imunização prévia por bacterina heteróloga reduz a sobrevivência após infecção.	124
4.20.3 Efeito da utilização de anti-inflamatório sobre a sobrevivência e sintomatologia de hamsters infectados	126
4.20.4 Detecção de protrombina e de inibidores de trombina no soro de animais tratados com anti-inflamatório	130
4.20.5 Detecção de Fator Tissular em amostras de soro de hamsters infectados	132
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	136
6 CONCLUSÕES.....	140
REFERÊNCIAS.....	141
ANEXO.....	157

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microbiologia e biologia celular de *Leptospira* spp.

As leptospiras são bactérias finas e extremamente móveis, de 6 a 20 µm de comprimento, enroladas helicoidalmente, e que podem compreender tanto espécies patogênicas, capazes de causar doença, quanto saprofíticas (FAINE et al., 1999; HAAKE et al., 2000; HAAKE et al., 2002; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; LEVETT, 2001). São espiroquetas contidas no gênero *Leptospira*, que pertence à família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales (FAINE et al., 1999), apresentando como distinção morfológica em relação a outras espiroquetas um formato único de suas extremidades em gancho ou ponto de interrogação (FAINE et al., 1999; LI et al., 2000) (Figura 1).

Figura 1- Morfologia de *Leptospira* spp.

Microscopia eletrônica de varredura de *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae.
Fonte: Levett, 2001

É necessária a impregnação por sais de prata pelo método de Fontana-Tribondeau ou observação direta por microscopia de campo escuro ou contraste de fase para a visualização destas bactérias, uma vez que não são coradas pelo método de Gram (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

As leptospiras são organismos aeróbios obrigatórios e possuem um melhor crescimento em temperaturas entre 28 e 30 °C, em meio suplementado com ácidos graxos de cadeia longa, vitamina B1 e B12 e sais de amônio (BHARTI et al., 2003; KO; GOARANT;

PICARDEAU, 2009). Porém, seu crescimento é bastante lento, especialmente no que tange às cepas patogênicas, as quais possuem um tempo de geração de aproximadamente 16 horas.

Por meio da β -oxidação, as leptospiplas utilizam os ácidos graxos de cadeia longa como única fonte de carbono e energia, sendo o meio de cultura mais utilizado o Ellinghausen–McCullough/Johnson–Harris (EMJH), o qual contém ácido oleico, albumina sérica, utilizada como detoxificante, e polisorbato (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; LEVETT, 2001). Embora as leptospiplas expressem todas as proteínas da via glicolítica, sugere-se que estas não utilizam a glicose como fonte de energia por conta de um sistema de captação ineficiente (NASCIMENTO et al., 2004a; NASCIMENTO et al., 2004b).

Visualização microscópica e experimentos *in vitro* demonstram que as leptospiplas, tanto patogênicas quanto saprofíticas, são capazes de se agregar e formar biofilme, sendo este fenômeno proposto como um mecanismo empregado por essas bactérias para sobreviver em diferentes nichos (RISTOW et al., 2008).

A maior parte das cepas patogênicas de *Leptospira* pode sobreviver em meios carentes em nutrientes, como solo úmido e água fresca por longos períodos (TRUEBA et al., 2004). Em condições laboratoriais, já foi relatado que as leptospiplas conseguem sobreviver por muitos meses em água mineral, mesmo em baixas temperaturas (ANDRE-FONTAINE; AVIAT; THORIN, 2015; TRUEBA et al., 2004). Porém, a espécie *L. borgpetersenii* não sobrevive fora do hospedeiro e isto é atribuído à perda de genes necessários à adaptação a diferentes nichos, devido à redução genômica observada nesta espécie (BULACH et al., 2006).

As condições que impactam a sobrevivência das bactérias em condições laboratoriais são incubações a altas temperaturas (37 °C) e/ou pH fora da zona de neutralidade (STODDARD et al., 2014) e a interação com outros micro-organismos (BARRAGAN et al., 2011; KUMAR et al., 2015).

As leptospiplas compartilham características tanto de bactérias Gram-positivas quanto de Gram-negativas (Figura 2). A dupla membrana e a presença de lipopolissacarídeos de superfície (LPS) são características típicas de bactérias Gram-negativas, ao passo que a forte associação de uma espessa camada de peptidoglicano com a membrana citoplasmática é uma característica de bactérias Gram-positivas (BHARTI et al., 2003; HAAKE; MATSUNAGA, 2010; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Outras espiroquetas, tais como *Treponema pallidum*, *Treponema denticola* e *Borrelia burgdorferi*, não possuem LPS (BOON HINCKLEY et al., 2005; HAAKE; MATSUNAGA,

2010), sendo este um diferencial em relação às leptospiros, cujo LPS é o componente majoritário de sua membrana externa (HAAKE; ZÜCKERT, 2015).

O LPS das leptospiros se assemelha estruturalmente e imunologicamente ao LPS de outras bactérias Gram-negativas, porém foi mostrado por diferentes metodologias que é menos endotóxico do que o de *E. coli* (FAINE et al., 1999). O lipídeo A das leptospiros contém características pouco comuns, incluindo uma metilação do único fosfato contido no dissacarídeo de glucosamina (QUE-GEWIRTH et al., 2004). Análises bioquímicas comparativas entre o LPS de uma cepa patogênica e uma intermediária apontam que a primeira apresenta carboidratos e lipídeos diferenciais, como fucose e hidroxipalmitato, respectivamente, além de um maior peso molecular e complexidade (PATRA et al., 2015).

Logo após a descrição do patógeno, as leptospiros eram divididas em duas espécies sorológicas distintas, com a maioria das espécies patogênicas agrupadas no complexo “interrogans”. Todas outras cepas saprofíticas eram classificadas dentro do complexo “biflexa” (BHARTI et al., 2003; KMETY; DIKKEN, 1993; PLANK; DEAN, 2000).

Figura 2- Modelo esquemático da arquitetura de membrana de *Leptospira* spp.

As leptospiros apresentam uma membrana dupla, constituída pela membrana citoplasmática ou interna (MI) e externa (ME), dentre as quais se localiza o espaço periplasmático (EP), no qual se encontram os dois endoflagelos (F) e uma espessa camada de peptidoglicano (PG), fortemente associada à MI. O componente preponderante da ME das leptospiros são os lipopolissacarídeos (LPS), cujas diferenças estruturais e químicas determinam a diversidade antigênica dessas bactérias. Aqui também estão ilustradas algumas proteínas expostas já descritas na literatura, todas elas com propriedades de adesinas.

Fonte: Adaptado de Fernandes et al., 2016.

O gênero *Leptospira* engloba mais de 250 sorovares, que são definidos pelo teste de microaglutinação (MAT) (PLANK; DEAN, 2000). O termo sorovar se enquadra em uma classificação sorológica que tem como base a expressão de LPS com diferenças estruturais e químicas (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010); quando sorovares distintos apresentam antígenos em comum, ou seja, um determinado grau de reação cruzada, estes são agrupados em um mesmo sorogrupo.

Além da classificação sorológica existe uma classificação genética baseada em análise de hibridização de DNA, a qual indica que existem pelo menos 19 espécies, sendo 13 patogênicas e 6 saprofíticas (BRENNER et al., 1999; LEVETT, 2001). Análises filogenéticas do gene 16S do RNA ribossômico (RNAr) sugere que espécies de *Leptospira* se dividem em três grupos distintos: espécies patogênicas, intermediárias e saprofíticas (LEVETT et al., 2006).

Baseando-se nesta classificação mais recente, o grupo das espécies saprofíticas (*L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. kmetyi*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, e *L. yanagawae*) forma o ramo mais afastado filogeneticamente, enquanto o grupo das espécies patogênicas engloba 8 espécies (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, e *L. alstonii*), sendo que cerca de metade dos sorovares patogênicos é classificada em *L. interrogans* ou *L. borgpetersenii* (BRENNER et al., 1999); outro ramo evolucionário é compreendido pelo grupo das chamadas espécies intermediárias (*L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii*, *L. licerasiae*), as quais têm sido isoladas de humanos e animais e podem causar uma variedade manifestações clínicas brandas (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

A classificação sorológica pelo teste MAT não é indicativa de relação taxonômica entre as diferentes cepas, uma vez que um sorovar pode pertencer a mais de uma espécie genética e membros do mesmo grupo genético não necessariamente pertencem ao mesmo sorogrupo (BHARTI et al., 2003; KMETY; DIKKEN, 1993). A falta de associação entre a classificação genética e sorológica sugere que os genes envolvidos na biossíntese dos LPS possam ter sido adquiridos por transferência lateral (DE LA PEÑA-MOCTEZUMA et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; ZUERNER et al., 2000).

A reclassificação das leptospiras por critérios genéticos fornece informações taxonômicas importantes, mas é independente da classificação sorológica estabelecida, que é mais conhecida por epidemiologistas e clínicos. Portanto, as designações de sorogrupos e

sorovares continuarão a ser usadas, funcionando como uma complementação à classificação genética (BHARTI et al., 2003).

A presença de dois endoflagelos periplasmáticos garante às leptospiros sua intensa mobilidade (CHARON; GOLDSTEIN, 2002), sendo que eles partem de cada extremidade da célula e terminam no centro da mesma (LIAO et al., 2009). A mobilidade destas bactérias é relevante à sua biologia básica e, apesar de ser um evento comum também às leptospiros saprofíticas, é comprovadamente um fator de virulência, uma vez que a inativação de diferentes genes de proteínas que compõem o flagelo tornam as leptospiros avirulentas em modelo animal (FONTANA et al., 2016; LAMBERT et al., 2012; LIAO et al., 2009; WUNDER et al., 2016a).

Quando bactérias patogênicas e virulentas são recém-isoladas de animais infectados, apresentam uma maior movimentação em comparação a cepas atenuadas mantidas *in vitro*; esta mobilidade diferencial pode favorecer a penetração do patógeno por tecidos e matrizes extracelulares e consequentemente a disseminação para órgãos-alvos (LI et al., 2000).

1.2 Leptospirose: epidemiologia e sintomas

A leptospirose, primeiramente descrita como doença de Weil em 1886 por Adolf Weil, é uma doença sistêmica causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (LEVETT, 2001), sendo atualmente a zoonose mais disseminada globalmente, acometendo tanto humanos quanto animais, principalmente cães, gado e porcos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Mais de meio milhão de casos de leptospirose severa são reportados a cada ano, com taxas de mortalidade que excedem 10% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003), representando um grande problema econômico para a saúde pública. Acredita-se que o número de casos de leptospirose no mundo seja muito maior do que a Organização Mundial de Saúde estima, sendo possível que mais de um milhão de novas infecções por ano possam acontecer (COSTA et al., 2015).

Essa subestimativa se deve principalmente ao fato de que a maioria dos pacientes com leptospirose não são diagnosticados ou ainda são diagnosticados erroneamente com malária (CRUMP et al., 2013), dengue (BRUCE et al., 2005; FLANNERY et al., 2001) e outras doenças febris agudas. A falta de um diagnóstico rápido e adequado tem contribuído para a

subnotificação dos casos, bem como a ocorrência de infecções assintomáticas em regiões endêmicas.

A infecção pelas cepas patogênicas comumente ocorre por meio de contato direto com urina de animais contaminados ou indiretamente por meio de água e solo contaminados (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999). Praticamente todo mamífero pode servir como reservatório das leptospiras, albergando-as em seus túbulos proximais dos rins, com consequente liberação das leptospiras pela urina. As leptospiras entram no organismo por meio de cortes ou abrasão na pele, poros dilatados após contato prolongado com água ou pelas membranas mucosas do olho, nariz e garganta (PLANK; DEAN, 2000). Um esquema do ciclo de transmissão da doença está ilustrado na Figura 3.

Figura 3-Ciclo de transmissão da leptospirose

As leptospiras, eliminadas pela urina de animais contaminados, podem infectar diretamente o homem, quando este entra em contato direto com a urina destes animais, ou indiretamente, por meio do contato com água e solos contaminados. A doença pode acometer diferentes órgãos, tendo uma sintomatologia bem complexa. O homem é considerado o hospedeiro acidental e terminal da leptospirose.

Fonte: Modificado de Ko et al., 2009.

O início dos sintomas em humanos pode acontecer desde imediatamente após a exposição ao patógeno (1 a 2 dias) até um mês após a exposição, e em sobreviventes, a infecção pode durar por meses (PLANK; DEAN, 2000). A incidência da doença é maior nos trópicos do que em regiões temperadas, porém a transmissão ocorre tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, nos quais a doença ocorre tanto em áreas urbanas

quanto rurais (BHARTI et al., 2003). Ocorrências da doença em países desenvolvidos estão correlacionados com exposição ocupacional (BENSCHOP et al., 2009; DESAI et al., 2009), turismo ou esportes aquáticos (MORGAN et al., 2002; STERN et al., 2010).

A leptospirose foi por muito tempo considerada uma doença ocupacional, associada a atividades como mineração, tratamento de esgoto, atividades de pecuária, medicina veterinária e empreitadas militares, nas quais o risco de exposição ao patógeno era mais alto (BHARTI et al., 2003). A importância relativa da exposição ocupacional tem diminuído desde a introdução de medidas de proteção; entretanto, a exposição às leptospiras após chuvas e inundações é bastante significativa em grandes centros urbanos, sobretudo em países em desenvolvimento (COSTA et al., 2015; RUSSELL et al., 2003; TREVEJO et al., 1998).

De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil são relatados cerca de 3 a 4 mil casos por ano, sendo que a maioria ocorre nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Paraná, Pernambuco e Espírito Santo. Contudo, os estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Roraima, Rio Grande do Norte e Paraíba são considerados regiões endêmicas. A Figura 4 apresenta um compilado dos dados epidemiológicos do Brasil.

Figura 4- Incidência e mortalidade associada à leptospirose no Brasil

Os dados de incidência e mortalidade anual foram coletados do site do Ministério da Saúde do Brasil. Os dados referentes a 2016 se referem apenas ao primeiro semestre.

Fonte: Ministério da Saúde.

Um dos fatores responsáveis pelo aumento do número de casos de leptospirose são enchentes e alagamentos causados durante os períodos de chuva. Esta condição é propícia para a disseminação das bactérias eliminadas na urina dos roedores, que são os principais reservatórios da doença. *Rattus norvegicus* (rato de esgoto) e *Rattus rattus* (rato de telhado)

são considerados os carreadores principais na maioria dos casos reportados de leptospirose em humanos, excretando altas concentrações de leptospiras na urina meses após a infecção inicial, uma vez que são resistentes à infecção e assintomáticos, podendo ser considerada uma relação comensal entre as bactérias e esses animais (BHARTI et al., 2003; EVANGELISTA; COBURN, 2010).

Alguns roedores, como hamsters (*Mesocricetus auratus*), gerbil (*Meriones unguiculatus*) e porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*), são bastante suscetíveis à leptospirose, e podem servir como modelo animal para leptospirose humana. Anfíbios, cobras, aves e peixes também foram mostrados como animais com potencial de albergar leptospiras (JOBBINS; ALEXANDER, 2015; MGOODE et al., 2015; MINETTE, 1983), porém pouco se discute sobre a relevância desses animais na transmissão da leptospirose. Quando as leptospiras estão fora dos hospedeiros ou do meio de cultura, elas não se replicam (GREENE; MILLER; BROWN, 1998), mas podem permanecer viáveis por vários meses.

Os humanos são considerados os hospedeiros acidentais e terminais, apresentando infecção aguda que algumas vezes progride para um quadro fatal (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Os humanos sempre adquirem a leptospirose de uma fonte animal, sendo que até o presente momento não há relatos de transmissão de humano para humano.

As descrições da doença incluem um quadro sintomático bifásico, autolimitado, e um fatal (HEATH JR; ALEXANDER; GALTON, 1965). No quadro bifásico, a fase inicial é caracterizada pela presença das bactérias na corrente sanguínea, durando por aproximadamente uma semana. A maioria dos casos apresenta uma doença febril de início súbito sendo que muitos relatos clínicos têm indicado a presença de febre em praticamente todos os casos relatados de leptospirose (BHARTI et al., 2003). Por apresentarem às vezes manifestação subclínica com sintomas bastante brandos, muitas pessoas não procuram atendimento médico. Este tipo de infecção assintomática é comum em regiões onde a doença é endêmica.

A atenuação dos sintomas coincide com a fase imune, na qual os anticorpos começam a ser produzidos e, portanto, as bactérias não mais se encontram na corrente sanguínea (leptospirúria) sendo excretadas pela urina. Entretanto, a febre pode reaparecer após 3-4 dias, produzindo o quadro bifásico. Na maioria dos casos, o quadro bifásico é similar a de outras doenças febris (LEVETT, 2001).

Na fase inicial, a leptospirose também é caracterizada por calafrios, dores de cabeça e muscular, podendo ocorrer evolução dos sintomas para uma complicação generalizada, conhecida como Síndrome de *Weil*, que ocorre em 5-15% dos casos, com taxas de mortalidade de 5-40% (COSTA et al., 2015; FAINE et al., 1999; PLANK; DEAN, 2000). Este quadro é caracterizado por falência de órgãos, incluindo icterícia, meningite, hemorragia, disfunção renal e hepática e colapso cardiovascular. Lesões endoteliais e focos hemorrágicos são observadas em todos os órgãos afetados (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; KO et al., 1999). Durante a leptospirose, também ocorre dano hepatocelular e rompimento das junções intercelulares entre os hepatócitos, resultando em liberação de bilirrubina, responsável pela icterícia observada nos casos da doença (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

A severidade da doença é multifatorial, dependendo de variáveis como a cepa ou sorovar infectante de *Leptospira* envolvidos, concentração do inóculo, pelo menos para algumas cepas, bem como a idade e situação de saúde e imune do indivíduo infectado (LEVETT, 2001). Adicionalmente, a forma severa da doença está normalmente associada com os sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni e Lai (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). No Brasil, o sorovar Copenhageni é o prevalente nos grandes centros urbanos (NASCIMENTO et al., 2004b).

A síndrome pulmonar hemorrágica associada à leptospirose (LPHS) foi primeiramente reportada na Suíça (MOESCHLIN, 1943), e desde então tem sido reportada com frequência em diferentes regiões (PARK et al., 1989). Esta síndrome pode ocorrer esporadicamente ou associada a surtos da doença, neste caso sendo normalmente confundida com pneumonia viral (SEHGAL; MURHEKAR; SUGUNAN, 1995; TREVEJO et al., 1998). Por exemplo, a causa de um surto de síndrome pulmonar hemorrágica que ocorreu após chuvas e enchentes na Nicarágua foi inicialmente atribuída à infecção por hantavírus até que impregnações por prata e imunohistoquímica dos tecidos pulmonares revelaram a presença de leptospiras (TREVEJO et al., 1998).

Subsequentemente, a LPHS emergiu como uma das principais causas de febre hemorrágica em países em desenvolvimento (MACIEL et al., 2008; MAROTTO et al., 1999). Uma das características deste quadro é o sangramento intenso dos pulmões e dano tecidual agudo. Os sintomas podem ser moderados e pouco específicos, incluindo dor no peito, tosse e dispneia, que aparecem geralmente entre o quarto e sexto dia da doença. Os índices de

mortalidade de LPHS podem chegar a 30-70%, e a morte se dá em até 72 horas após o aparecimento dos sintomas (NICODEMO et al., 1997).

Os pacientes que desenvolvem LPHS apresentam altas concentrações de DNA de leptospira nos pulmões embora o número de bactérias intactas seja pequeno (NICODEMO et al., 1997; SEGURA et al., 2005), sugerindo um efeito indireto. Evidências epidemiológicas sugerem que esta síndrome pode ser um problema relativamente recente, sugerindo a emergência de um novo isolado de *L. interrogans* com virulência aumentada. Entretanto, é possível que seja um problema antigo que finalmente tem sido reconhecido e documentado (HAAKE; LEVETT, 2015).

1.3 Diagnóstico e tratamento

O controle de doenças infecciosas depende diretamente da disponibilidade de testes diagnósticos eficientes. O diagnóstico clínico da leptospirose é difícil devido aos sintomas inespecíficos da doença, além de um quadro muitas vezes heterogêneo (COSTA et al., 2015; LEVETT, 2001). De fato, Sasaki et al. (1993) reportaram que os médicos suspeitam de apenas 30% dos casos confirmados de leptospirose durante o diagnóstico clínico inicial.

O teste de microagutinação (MAT, do inglês *microscopic agglutination test*) ainda hoje é considerado o teste “padrão ouro” para diagnóstico de leptospirose, sendo específico para sorovares ou sorogrupos de *Leptospira* spp. (FAINE et al., 1999); porém, este teste não permite o diagnóstico precoce da doença, uma vez que detecta a presença de anticorpos contra a bactéria, principalmente anticorpos anti-LPS, os quais são gerados normalmente em 5-7 dias após a exposição ao patógeno (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007).

Para execução do MAT, diferentes diluições do soro do possível paciente com leptospirose são misturadas com suspensões vivas de leptospiros mantidas em laboratórios, e o título do soro é considerado a diluição máxima que fornece 50% de aglutinação após visualização em microscópio de campo escuro (LANGSTON; HEUTER, 2003). Porém, este teste é um pouco demorado, feito apenas em laboratórios de referência e exigindo pessoal altamente capacitado (BHARTI et al., 2003; CHAPPEL et al., 2004).

O MAT não consegue fazer distinção entre anticorpos resultantes de infecção ou vacinação, o que é problemático em relação a animais, uma vez que vacinas veterinárias são compostas de uma preparação de leptospiros mortas ou inativadas (NAIMAN et al., 2001;

WANG; JIN; WEGRZYN, 2007). Recentemente, Velineni e Timoney (2016) propuseram um teste de ELISA para distinção entre animais vacinados e naturalmente infectados.

As leptospirosas podem ser visualizadas por observação direta via microscopia de amostras clínicas. Microscopia de campo escuro de amostras de sangue, urina e fluido cérebro-espinhal tem sido usada para diagnóstico precoce (LEVETT, 2001). Entretanto, a sensibilidade deste método é baixa, sendo que são necessárias aproximadamente 10^4 leptospirosas/mL para observação de pelo menos uma bactéria por campo. As leptospirosas no sangue podem ser detectadas somente nos primeiros dias de infecção, enquanto durar a leptospirose.

O isolamento das bactérias em amostras de sangue e urina também é possível; no caso de amostras de sangue, estas devem ser retiradas o mais rapidamente possível, logo após o aparecimento dos sintomas. Neste procedimento, uma ou duas gotas de sangue são inoculadas em meio semi-sólido contendo 5-fluorouracil, um antibiótico para seleção de leptospirosas (JOHNSON; ROGERS, 1964). No entanto, o crescimento das bactérias é bastante lento em um isolamento primário, com uma fase lag bastante longa, o que dificulta o diagnóstico na fase inicial da doença (TOYOKAWA; OHNISHI; KOIZUMI, 2011).

O diagnóstico da leptospirose também pode ser efetuado pela amplificação de DNA da bactéria contida no sangue, urina, fluido cerebrospinal e humor aquoso (ARITA et al., 2016; BROWN et al., 2003; LEVETT, 2001; WAGGONER; PINSKY, 2016). Nos últimos anos, muitos protocolos de PCR empregando diferentes combinações de oligonucleotídeos para detecção de DNA de leptospirose em materiais clínicos foram desenvolvidos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; WAGGONER; PINSKY, 2016). A Organização Mundial da Saúde descreve um protocolo de PCR baseado na amplificação do gene da flagelina e do gene *secY* (WHO, 2003). Entretanto, o diagnóstico por PCR ainda não foi completamente implementado visto que muitos laboratórios ainda não são equipados para realizar tais testes.

O aumento da sensibilidade deste método diagnóstico tem sido obtido por meio da utilização de PCR quantitativo usando sondas TaqMan (FERREIRA et al., 2014) ou SYBR green (DENIPITIYA et al., 2016; LEVETT et al., 2005). Também foi descrita a detecção de leptospirosas pela amplificação do DNA genômico utilizando a técnica de amplificação isotérmica (LAMP), com uso de oligonucleotídeos que amplificam o gene do RNAr 16S (SUWANCHAROEN et al., 2012) e LipL32 (SEESOM et al., 2015).

Anticorpos IgM contra leptospirosas são detectados principalmente durante a primeira semana da doença (ADLER et al., 1980; BHARTI et al., 2003) e muitos ensaios de ELISA

foram propostos para detecção destes anticorpos. Os antígenos imobilizados podem ser lisados totais de leptospiros ou proteínas recombinantes (CHALAYON et al., 2011; DONG et al., 2008; NATARAJASEENIVASAN et al., 2011; SRIMANOTE et al., 2008).

Um estudo recente propôs a combinação de técnicas de detecção de anticorpos anti-leptospiros e DNA para um diagnóstico eficiente e precoce para leptospirose. Foram empregadas as técnicas de MAT, ELISA, teste imunocromatográfico e amplificação do DNA bacteriano por LAMP e PCR em tempo real, sendo os resultados obtidos bem promissores, porém de difícil aplicabilidade prática (IWASAKI et al., 2016).

Mais recentemente, Lee et al. (2016) desenvolveram um método imunocromatográfico para diagnóstico rápido da leptospirose, contendo como antígeno a porção polissacarídica derivada do LPS da espécie saprofítica *L. biflexa*, obtendo altas taxas de sensibilidade e especificidade.

Após confirmação da doença, normalmente pelo teste padrão-ouro, o tratamento envolve a utilização de antibióticos como oxitetraciclina, doxiciclina e penicilina (RUSSELL, 1958). A terapêutica com antibiótico parece reduzir o avanço dos sintomas e a ocorrência de sequelas, podendo prevenir a evolução para as manifestações mais graves da doença, por isso seu uso é recomendado (SEHGAL, 2000; WATT et al., 1988) mesmo que muitos casos de leptospirose sejam autolimitados (BHARTI et al., 2003; GRIFFITH; HOSPENTHAL; MURRAY, 2006; VINETZ, 2003).

Recentemente, Ratet et al. (2014) empregaram um modelo de leptospiros virulentas bioluminescentes para se avaliar o efeito do uso de diferentes antibióticos no controle da infecção, pela visualização direta das bactérias em modelo animal. Este modelo pode favorecer o avanço do desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para controle da doença.

Nos casos graves, nos quais há complicações renais, respiratórias ou hemorrágicas, os pacientes devem ser encaminhados a hospitais que disponham de capacidade para realizar procedimentos como diálise e terapia intensiva (HAAKE; LEVETT, 2015; LEVETT, 2001).

1.4 Mecanismos de patogenicidade descritos

Os mecanismos moleculares da patogênese das leptospiros estão sendo gradativamente elucidados, sendo que atualmente alguns fatores de virulência já foram identificados, por meio de ensaios *in vitro* e, em alguns casos, consequente validação dos fenômenos biológicos lançando-se mão de ferramentas genéticas para criação de mutantes *knock out* (nos quais se

inativa um ou mais genes da cepa patogênica) ou *knock in* (inserção de gene na cepa saprofítica).

Os estágios iniciais para o processo infeccioso é a penetração das bactérias através da pele lesionada ou íntegra com poros dilatados, invasão tecidual, a qual é favorecida pelo movimento translacional das bactérias (WUNDER et al., 2016a) e colonização, a qual se dá via interação das leptospiros com componentes da matriz extracelular e células do hospedeiro (BARBOSA et al., 2006; EVANGELISTA et al., 2014b). Também já foi mostrado que tecidos adiposos são os primeiros sítios de colonização das leptospiros após infecção subcutânea experimental (OZURU et al., 2017).

Muitos estudos em relação à aderência das leptospiros focam na ligação destas a componentes da matriz extracelular; muitas cepas de *Leptospira* spp. se aderem a componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo I, colágeno tipo IV, laminina e fibronectina (ATZINGEN et al., 2008; BARBOSA et al., 2006). Até o presente, muitas adesinas alocadas na membrana externa de leptospira já foram descritas (FERNANDES et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2015).

É provável que a interação das leptospiros com células endoteliais e células epiteliais dos túbulos renais seja crucial para a disseminação e persistência da bactéria, respectivamente. A adesão de *L. interrogans* a células endoteliais, epiteliais e fibroblastos, cultivadas *in vitro* já foi demonstrada (BALLARD et al., 1986; ITO; YANAGAWA, 1987; MERIEN; BARANTON; PEROLAT, 1997). Na maioria dos casos, as cepas virulentas se ligam mais eficientemente às linhagens celulares do que as avirulentas ou saprofíticas.

As células endoteliais expressam um componente chamado de E-caderina, o qual é responsável pela adesão célula-célula, mantendo a integridade do tecido endotelial. *L. interrogans* se liga *in vitro* à E-caderina purificada e o bloqueio deste componente nas células endoteliais por meio de anticorpo específico é capaz de inibir a ligação das leptospiros às células (EVANGELISTA et al., 2014a). A ligação a este componente poderia resultar em dano vascular e consequentemente facilitar a disseminação do patógeno da corrente sanguínea para diferentes tecidos.

Ao atingir a corrente sanguínea, as leptospiros devem sobreviver ao ataque lítico do sistema complemento para que então possam se disseminar aos órgãos alvos. Estudos recentes apontam que após inoculação intraperitoneal e ocular, as leptospiros já são capazes de se alojar nos órgãos alvos no intervalo de uma hora (WUNDER et al., 2016b) e uma confluência de diferentes mecanismos pode contribuir para essa rápida disseminação.

Estudos demonstram que as concentrações de leptospira no sangue durante a fase de leptospiremia podem variar de 10^2 a 10^6 bactérias/mL (AGAMPODI et al., 2012), sendo que concentrações acima de 10^4 normalmente estão associadas a prognósticos ruins (SEGURA et al., 2005; TRUCCOLO et al., 2001), devendo-se levar em conta também a virulência da cepa infectante em consideração.

Nosso grupo demonstrou que as leptospiras são capazes de capturar o plasminogênio circulante no plasma (VIEIRA et al., 2009) por meio de distintos receptores proteicos expostos na superfície da bactéria (VIEIRA; NASCIMENTO, 2015) e subverter a maquinaria do hospedeiro para ativar o plasminogênio ligado à sua forma enzimaticamente ativa, a plasmina, utilizando-se de ativadores do próprio hospedeiro; assim, as leptospiras se recobrem de um potencial proteolítico, sendo capazes de degradar componentes da matriz extracelular, como laminina e fibronectina plasmática, o que potencializa sua capacidade de disseminação.

Foi demonstrado também que a geração de plasmina na superfície das leptospiras interfere na deposição de C3b e IgG *in vitro*, provavelmente por meio da degradação destes componentes, o que pode contribuir para a diminuição do processo de opsonização, e consequentemente para a evasão imune da bactéria (VIEIRA et al., 2011).

O primeiro estudo reportando a evasão do sistema complemento por leptospiras patogênicas foi feito por Meri et al. (2005). Foi demonstrado que as cepas de leptospiras resistentes ao soro são capazes de se ligar ao Fator H, o qual, quando ligado à superfície das leptospiras, permanece ativo funcionalmente, atuando como cofator na clivagem de C3b pelo Fator I. As leptospiras também possuem a capacidade de se ligar a C4bp (*C4 binding protein*), um inibidor da via clássica e das lectinas do complemento, o qual mantém sua atividade de cofator, atuando na clivagem de C4 mediada por Fator I, indicando que a aquisição deste regulador do complemento pode contribuir para a resistência ao soro pelas leptospiras (BARBOSA et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2016a).

Toma et al. (2011) demonstraram que *L. interrogans* é capaz de sobreviver, replicar e escapar de macrófagos de camundongo, o que possibilita sua disseminação em órgãos alvos. Li et al. (2010) mostraram que as leptospiras fagocitadas por macrófagos humanos são capazes de escapar dos fagossomos para o citossol, onde elas proliferam e ativam a via de apoptose dessas células, por meio da proteína de superfície Loa22 (WU et al., 2011), sabidamente um fator de virulência (RISTOW et al., 2007). As proteínas de superfície Mce (do inglês, *mammalian cell entry*) e LMB216 são responsáveis pela adesão das leptospiras a macrófagos e sua respectiva invasão (TOMA et al., 2014; ZHANG et al., 2012).

As leptospirosas patogênicas provavelmente estão em contato com altas concentrações de espécies reativas de oxigênio induzidas pelo hospedeiro durante a resposta imune inata. Eshghi et al. (2012) mostraram que o gene *katE*, anotado como a única catalase de *Leptospira* spp. patogênicas, codifica uma catalase funcional, que garante um aumento de sobrevivência das cepas patogênicas em relação às saprofíticas; em suma, a inativação do gene *KatE* nas cepas patogênicas diminuiu drasticamente a viabilidade destas bactérias na presença de H_2O_2 extracelular e reduziu a virulência em modelo animal de infecção aguda.

Nosso grupo também demonstrou que cepas de leptospirosas, sobretudo as patogênicas e virulentas, são capazes de capturar o fibrinogênio humano e reduzir sua disponibilidade à enzima trombina *in vitro*, o que acarreta numa menor formação do coágulo de fibrina (OLIVEIRA et al., 2013), podendo este fenômeno ajudar na disseminação das bactérias na fase inicial da doença. A formação do coágulo de fibrina tem sido mostrada como um processo chave na contenção de patógenos e inibição da disseminação dos mesmos (RIVERA et al., 2007). Até o momento, várias proteínas recombinantes demonstraram capacidade de interação com o fibrinogênio humano e diferentes níveis de inibição da formação do coágulo de fibrina (LIN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2016b).

Existe intenso comprometimento hepático nos casos severos de leptospirose. Já foi mostrado que *L. interrogans* é capaz de induzir apoptose em hepatócitos de porquinhos-da-índia infectados (MERIEN et al., 1998) e que espécies patogênicas de *Leptospira* invadem as junções intercelulares de hamsters infectados, favorecendo a destruição das mesmas, ocasionando o extravasamento de bilirrubina e aparecimento de icterícia (MIYAHARA et al., 2014). Uma vez que muitos fatores de coagulação são sintetizados em células do fígado, o dano neste órgão pode favorecer indiretamente o aparecimento de manifestações hemorrágicas durante a leptospirose.

As leptospirosas apresentam um vasto repertório de mecanismos que possibilitam um eficiente processo infeccioso, e em muitos casos, uma grande plasticidade e redundância funcional é encontrada. Assim sendo, ficamos interessados em avaliar a interação de diferentes cepas de leptospirosas com outras moléculas do sistema de coagulação.

1.5 Sistema de coagulação

Os componentes do sistema hemostático incluem as plaquetas, os vasos, as proteínas da coagulação solúveis do sangue, os anticoagulantes naturais e o sistema de fibrinólise. O

equilíbrio funcional entre estes diferentes componentes é garantido por uma variedade de mecanismos, envolvendo interações entre proteínas, respostas celulares complexas, e regulação de fluxo sanguíneo (AIRD, 2005).

A formação do coágulo de fibrina no sítio de lesão endotelial representa um processo crítico para a manutenção da integridade vascular. Os mecanismos envolvidos nesse processo, constituintes do sistema hemostático, devem ser regulados para simultaneamente, contrapor-se à perda excessiva de sangue e evitar a formação de trombos intravasculares, decorrentes de formação excessiva de fibrina. Após a lesão ocorrer ao vaso sanguíneo causando dano às células endoteliais, as plaquetas formam imediatamente um tampão plaquetário no local da lesão, constituindo a chamada hemostasia primária. A hemostasia secundária acontece quando os componentes do plasma, chamados fatores de coagulação, são ativados para formar fibras de fibrina, as quais fortalecem o tampão plaquetário (ESMON et al., 1999; OKAMOTO; TAMURA; SAWATSUBASHI, 2016; WOLBERG; CAMPBELL, 2008).

Nos anos de 1960, dois grupos distintos propuseram um modelo da coagulação em cascata, o qual seria composto por etapas sequenciais nas quais a ativação de um fator de coagulação levaria a ativação do fator seguinte, culminando na geração de trombina (DAVIE; RATNOFF, 1964; MACFARLANE, 1964). Cada fator de ativação existiria na forma de pró-enzima, a qual poderia ser convertida na enzima funcional.

Este modelo original foi subsequentemente modificado para incluir a observação de que algumas moléculas pró-coagulantes eram cofatores e não possuíam atividade enzimática. Atualmente, o processo coagulatório é definido em um modelo “em Y”, no qual duas vertentes, didaticamente separados em Via Intrínseca (via de contato, iniciada pelo fator XII, FXII) e Via Extrínseca (iniciada pelo complexo fator tissular, FT, e o fator VII ativado, FVIIa) convergem para uma via final comum por meio da formação de FXa, o qual age sobre a molécula de protrombina, convertendo-a em trombina, enzima responsável pela formação do coágulo de fibrina (HOFFMAN; MONROE, 2007). A trombina é constituída por duas cadeias, uma leve de aproximadamente 6 kDa e uma pesada, com cerca de 31 kDa, unidas por uma ponte dissulfeto (DI NISIO; MIDDELDORP; BÜLLER, 2005; SILLER-MATULA et al., 2011). Um esquema do processo de ativação da protrombina e dos produtos formados está ilustrado na Figura 5.

Figura 5- Representação da clivagem de protrombina em trombina

A protrombina é clivada *in vivo* pelo FXa em dois resíduos de arginina, liberando um fragmento de ativação (F1+2) e a cadeia leve (A, de aproximadamente 6 kDa) e pesada (B, 31kDa), unidas por uma ponte dissulfeto e resultando na enzima trombina.

In vivo, a geração de trombina é um processo altamente dinâmico e multifatorial. A coagulação envolve interações específicas entre superfícies celulares, zimógenos e cofatores (WOLBERG; CAMPBELL, 2008). As reações são tipicamente descritas em três fases: iniciação, amplificação e propagação.

Durante a fase de iniciação, o evento desencadeador da coagulação é a exposição do FT ao sangue; este componente é uma glicoproteína transmembrana de 47 kDa expresso por células que não estão em contato direto com o sangue, como células subendoteliais e fibroblastos (MACKMAN, 2004); quando ocorre dano endotelial, este componente entra em contato com fatores do sangue no local da injúria e o processo coagulatório é iniciado. Cabe ressaltar também que a exposição de colágeno neste sítio faz com que as plaquetas se liguem e se ativem parcialmente, formando o “*plug*” primário. Quando ligado ao FT, o zimógeno FVII é rapidamente convertido a FVIIa e o complexo FT/FVIIa resultante (chamado de complexo tenase extrínseco) catalisa a ativação do FX e FIX. O FXa resultante atua na ativação de protrombina em trombina, porém com uma cinética enzimática ainda pouco eficiente (HOFFMAN; MONROE, 2007).

Na fase de amplificação, a pequena quantidade de trombina inicialmente formada, ainda insuficiente para formação de um coágulo de fibrina, passa a agir sobre diversos substratos naturais, entre eles FVIII, FV e receptores na superfície de plaquetas, chamados de PAR (*Protease-activated receptors*). Agora, o FVa resultante se liga ao FXa pré-existente, formando o complexo protrombinase na superfície das plaquetas, o qual é muitas ordens de grandeza mais eficiente na conversão de protrombina em trombina (WOLBERG;

CAMPBELL, 2008). A clivagem dos receptores PAR resulta na ativação completa das plaquetas, as quais mudam sua forma e passam a emitir pseudópodes, aumentando sua superfície celular, além de liberarem grânulos contendo fatores de coagulação e de ativação plaquetária (JOHANSEN, 2015; PALTA; SAROA; PALTA, 2014). Adicionalmente, durante a ativação, a membrana das plaquetas se torna negativamente carregada por meio da translocação de fosfolipídeos da face interna para a face externa da membrana citoplasmática, favorecendo a ligação dos complexos tenase e protrombinase, na presença de cálcio.

Durante a propagação, a trombina formada passa a exercer um *feedback* positivo na sua própria síntese; a ativação plaquetária continuada fornece uma superfície para sustentar a constante ativação dos fatores de ativação e montagem dos complexos protrombinase e tenase intrínseco, formado pelo FIXa pré-existente e o recém-formado FVIIIa, resultante da ativação do FVIII mediada pela trombina. O complexo tenase intrínseco possui uma cinética bem mais favorável de ativação do FX em FXa (CHEE, 2014; HOFFMAN; MONROE, 2007; LEVI, 2010).

As reações de coagulação culminam na formação de grande quantidade de trombina, a qual age sobre o fibrinogênio solúvel convertendo-o em uma rede tridimensional de fibrina insolúvel, chamado coágulo de fibrina, o qual é considerado o “*plug*” secundário, reforçando o “*plug*” formado pelas plaquetas no sítio de lesão endotelial. Outro substrato natural da enzima é o FXIII, o qual é ativado em FXIIIa, uma transglutaminase responsável pela formação de ligações covalentes entre as fibras de fibrina, aumentando as propriedades viscoelásticas do coágulo e o reforçando (SILLER-MATULA et al., 2011; WOLBERG; CAMPBELL, 2008). Uma ilustração resumida do sistema de coagulação está apresentada na Figura 6.

As reações bioquímicas da coagulação do sangue devem ser estritamente reguladas, de modo a evitar ativação excessiva do sistema, formação inadequada de fibrina e oclusão vascular. De fato, a atividade das proteases operantes na ativação da coagulação é regulada por numerosas proteínas inibitórias, que atuam como anticoagulantes naturais (LEVI, 2005a).

A antitrombina é o principal inibidor de trombina, atuando também na inativação dos fatores IXa, Xa, XII e XIIa por meio da formação de complexos 1:1. A atividade da antitrombina é aumentada na presença de heparina; entretanto, a concentração plasmática de heparina é baixa e não contribui de maneira significativa à ativação *in vivo* desta molécula inibitória (LAROSA; OPAL, 2005; OPAL, 2000). Outros anticoagulantes solúveis incluem proteína C e S e inibidor da via do fator tissular (TFPI, do inglês, *tissue factor pathway*

inhibitor) (BUTENAS; VAN'T VEER; MANN, 1999; LEVI; VAN DER POLL, 2008; WOOD et al., 2014).

Figura 6- Reações do sistema de coagulação

O sistema de coagulação é didaticamente dividido em uma via intrínseca, se iniciando com a ativação de FXII em FXII ativado (FXIIa) e culminando na formação de FXa, uma via extrínseca, chamada também de via do fator tissular (FT) e também culminando na formação de FXa, e uma via comum, na qual o FXa formado atua na ativação de protrombina em trombina, a qual age sobre o fibrinogênio, transformando-o em uma rede insolúvel de fibrina. A trombina também age sobre outros fatores de coagulação, como FV e FVIII, cujos produtos de ativação aumentam a eficiência das reações de formação de trombina. Neste modelo, os cofatores não estão representados e as moléculas não estão em escala.

Existem alguns testes para se avaliar a eficiência das vias do sistema de coagulação, como por exemplo, o Tempo de Protrombina (referente à via extrínseca e comum da coagulação) e o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (referente à via intrínseca e comum). Para a realização do teste Tempo de Protrombina, o sangue do paciente é colhido em um tubo contendo citrato de sódio, o qual age como anticoagulante por sequestrar o cálcio da amostra, as frações são separadas e o plasma é colhido, ao qual é adicionado um excesso de cálcio para se reverter o estado pró-coagulatório; então, Fator Tissular é adicionado para que a via extrínseca se inicie, sendo medido o tempo transcorrido até a formação do coágulo de fibrina. Caso o tempo de coagulação seja maior que o referencial de indivíduos saudáveis,

conclui-se que algum componente está em quantidades deficientes, podendo ser fibrinogênio, protrombina, Fatores V, VII e X (HENEGHAN et al., 2006).

Para complementação do teste Tempo de Protrombina, realiza-se o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada, no qual a amostra de plasma é preparada de maneira semelhante, porém ao invés da adição de fator tissular, coloca-se um componente de ativação de contato, como por exemplo, caolim, ácido elágico, celite ou dextram (KORTE; CLARKE; LEFKOWITZ, 2000).

Muitos pacientes com leptospirose apresentam tempos aumentados nestes testes laboratoriais (CHIERAKUL et al., 2008), o que denota uma redução de um ou vários fatores de coagulação, acarretando em síndromes hemorrágicas. Porém, os mecanismos subjacentes a estes decréscimos e às conseqüentes manifestações hemorrágicas durante a doença não são ainda completamente compreendidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Os objetivos do presente trabalho são estudar a interação de bactérias do gênero *Leptospira* com componentes da via comum do sistema de coagulação.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a interação de diferentes cepas de *Leptospira* com os componentes protrombina e trombina;

Verificar se a interação das bactérias com a protrombina dificulta ou impede sua conversão à enzima trombina;

Avaliar se as leptospirosas são capazes de reduzir a atividade da trombina frente a um de seus substratos naturais, fibrinogênio;

Estudar o potencial proteolítico das leptospirosas sobre os componentes em estudo;

Identificar proteínas de superfície que possam mediar a interação com a trombina;

Utilizar o sistema de expressão heteróloga em cepa saprofítica de *Leptospira* para validar a função dos ligantes de trombina;

Avaliar os níveis de protrombina e antitrombina em soro de pacientes acometidos por leptospirose e em soro de hamsters experimentalmente infectados com diferentes cepas virulentas;

Associar os níveis destes componentes às manifestações hemorrágicas e definir se as causas destas alterações são diretas ou indiretas;

Avaliar o potencial inflamatório de diferentes cepas de *Leptospira* sobre esplenócitos murinos;

Avaliar o papel da inflamação sobre as concentrações de protrombina e inibidores de trombina no soro de animais infectados e consequentemente no aparecimento das manifestações hemorrágicas;

Avaliar as concentrações de Fator Tissular em amostras de soro de hamsters infectados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas de Bactérias e soros utilizados

No presente estudo foram utilizadas diferentes cepas de *Leptospira*. A cepa patogênica atenuada em cultura *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 e a cepa não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1 foram cultivadas a 28 °C sob condições aeróbias em meio EMJH líquido (Difco®, BD, Franklin Lakes, NJ ,USA) (ELLINGHAUSEN; MCCULLOUGH, 1965; JOHNSON; ROGERS, 1967) com 10% (v/v) de *Leptospira enrichment* EMJH (BD, Difco), enriquecido com L-asparagina (m/v: 0,001%), cloreto de magnésio (m/v: 0,001%), peptona (m/v: 0,03%) e extrato de carne (m/v: 0,001%). As cepas patogênicas e virulentas recém-isoladas de animal *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130, sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm (LPF) e sorovar Canicola cepa LO4 também foram utilizadas. As culturas de *Leptospira* spp. são rotineiramente mantidas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, SP, Brasil. As leptospirosas se duplicam aproximadamente a cada 16 horas e seu crescimento é lento no isolamento primário, de modo que as culturas são mantidas por até cerca de 13 semanas antes de serem descartadas (LEVETT, 2001). As leptospirosas de subcultura são cultivadas por em média 14 dias, e em seguida são novamente subcultivadas.

Para padronização dos experimentos no curso deste trabalho, as leptospirosas foram contadas em câmara de Petroff-Hauser, com utilização de um microscópio de luz invertida. O número total de bactérias visualizado nos 25 quadrantes centrais é multiplicado pela diluição empregada para contagem (normalmente 50 X) e pelo fator da câmara, 50.000. Usualmente, a contagem das bactérias após uma semana de crescimento permanece na ordem de 10^8 leptospirosas/mL.

Amostras de soros pareados de pacientes diagnosticados com leptospirose utilizadas neste estudo fazem parte de uma soroteca e foram cedidas pela Dra. Eliete C. Romero, do instituto Adolfo Lutz.

A linhagem de *E. coli* DH5 α (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizada para as etapas de clonagem e a linhagem BL21 (DE3) Star pLysS para os ensaios de expressão das proteínas recombinantes. Esta cepa possui o gene da T7 RNA polimerase integrado ao genoma sob controle do promotor lac UV5, o qual é induzido por IPTG (isopropil-B-D-tiogalactopiranosídeo), possuindo também um plasmídeo pLysS que expressa uma enzima que degrada a polimerase T7, impedindo a expressão basal na ausência do

indutor, além de possuir o gene da RNase E truncado, o que aumenta a estabilidade do mRNA nestas cepas (INVITROGEN, 2012).

As linhagens de *E. coli* $\pi 1$ (deficiente para dT) e $\beta 2163$ (deficiente para DAP, ácido diaminopimélico) (DEMARRE et al., 2005) foram empregadas nos experimentos de construção de *L. biflexa* recombinante.

3.2 Teste de Microaglutinação (MAT)

O ensaio de MAT é rotineiramente realizado no Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, conforme descrito por Faine et al. (1999). Foi empregada uma bateria de 25 sorovares de *Leptospira* spp. como antígeno: Whitcombi, Andamana, Australis, Autumnalis, Bataviae, Butembo, Canicola, Castellonis, Sentot, Copenhageni, Cynopteri, Bratislava, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Shermani, Tarassovi, Hardjo (hardjoprajitno), Hardjo (hardjobovis) e Wolffi. Todas as linhagens são mantidas em meio EMJH a 28 °C. Um teste é considerado positivo quando há um aumento de pelo menos quatro vezes na microaglutinação de amostras de soros pareados. O sorovar que apresentar um título de aglutinação de 50% na maior diluição é considerado o provável sorotipo predominante. O teste é considerado negativo se não houver aglutinação com nenhum dos sorovares listados acima.

3.3 Componentes biológicos e macromoléculas

Os componentes trombina humana e seu anticorpo correspondente (anti-trombina, SAB2100739), fator Xa bovino, fibrinogênio humano, albumina sérica bovina (do inglês, *bovine serum albumin*, BSA), plasminogênio de plasma humano e ativador de plasminogênio uPA, os inibidores de trombina hirugênio, hirudina e argatroban, antitrombina humana e seu respectivo anticorpo foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Protrombina de plasma humano foi obtida da Merck (Darmstadt, Germany), e o anticorpo anti-protrombina (anti-F2, SAB2106564) adquirido da empresa Sigma.

3.4 Interação em fase solúvel das leptospiiras com protrombina e trombina

Leptospiras foram coletadas do meio de cultura a 4.000 x g por 20 minutos, lavadas duas vezes com PBS (tampão fosfato-salino contendo 137 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) e ressuspensas em 200 µL de solução contendo 10 U/mL de trombina, equivalente a aproximadamente 5 µg/mL (Sigma), ou 2 µg/mL de protrombina (Merck) a uma concentração final de 5 x 10⁸ até 5 x 10⁶ células/mL. As cepas interagiram com os componentes solúveis por 2 horas a 30 °C; ao final da incubação, as misturas foram centrifugadas a 4.000 x g por 20 minutos e os sobrenadantes coletados e submetidos a uma nova centrifugação, a 8.000 x g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram imobilizados em placas de ELISA (Costar® High binding, Corning Incorporated, EUA) juntamente com concentrações decrescentes dos componentes em estudo, compondo uma curva padrão. A imobilização foi feita por 16 horas a 4° C, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (PBS contendo 0,05% Tween-20), bloqueadas por 2 horas com PBS-T contendo 1% BSA e então incubadas com anti-protrombina (1:1.000, Sigma) ou anti-trombina (1:3.000, Sigma), ambos desenvolvidos em coelho, por 1 hora a 37 °C. As concentrações dos componentes imobilizados, bem como dos anticorpos utilizados foram previamente otimizadas por experimentos de titulação. As placas foram lavadas e incubadas por 1 hora com solução contendo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:4.000, Sigma). As placas foram extensivamente lavadas e solução de *o*-phenylenediamine (OPD) (1 mg/mL) em tampão citrato-fosfato (pH 5) contendo 1 µL/mL H₂O₂ foi adicionada (100 µL/poço). A reação transcorreu por 10 minutos e foi interrompida com adição de 50 µL de 2 M H₂SO₄. As leituras de absorbância foram feitas no comprimento de onda de 492 nm em uma leitora de placas de ELISA (Multiskan EX; Thermo Fisher Scientific, Helsinki, Finland). Os valores de densidade óptica (DO) de cada tratamento foram comparados com os valores gerados pela curva padrão dos componentes. A massa residual de componente nos sobrenadantes das incubações foi usada para inferir a massa ligada à superfície das leptospiiras, por subtração.

3.5 Western blotting para detecção da ligação das cepas de *Leptospira* à protrombina e trombina

L. interrogans sorovar Copenhageni cepas FIOCRUZ L1-130 e M20 e *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1 (10⁹ células) foram incubadas com 200 µL de PBS 0,1% BSA contendo 20 U/mL de trombina (10 µg/mL) ou protrombina (40 µg/mL) por 2 horas a 37 °C.

Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 4.000 x g por 15 minutos e três tratamentos distintos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE): *pellet* ressuspenso, sobrenadante e *pellet* após uma lavagem com 1 mL de PBS. Foi utilizado um controle no qual não foram adicionadas trombina ou protrombina, para se excluir reatividade cruzada dos anticorpos com o extrato de leptospira. As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL; GE Healthcare) em sistema semi-úmido, as quais foram bloqueadas com PBS-T contendo 3% BSA e então incubadas com anticorpos anti-trombina (1:4.000, em PBS-T 3% BSA) ou anti-protrombina (1:2.000, em PBS-T 3% BSA) por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpos policlonais anti-IgG de coelho conjugados com peroxidase (1:4.000) por 1 hora. A reatividade das proteínas foi revelada por uso do reagente ECL para detecção de luminescência (GE Healthcare), detectada com ajuda do software *Carestream molecular imaging instrument* (Equilab, Whitestone, NY) conectado ao aparelho Gel Logic 2200PRO. A densitometria das bandas geradas foi mensurada pela utilização do software de análise de imagens *Gel Quantifier Image Analysis* (GelQuant, versão 2.7.0).

3.6 Avaliação da ligação das cepas de *Leptospira* à trombina por citometria de fluxo

L. interrogans sorovar Copenhageni cepas FIOCRUZ L1-130 e M20 e *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1 (10^9 células) foram incubadas com 200 µL de PBS 0,1% BSA contendo 20 U/mL de trombina (10 µg/mL) por 2 horas a 37 °C. Após três lavagens com PBS, as células foram incubadas com anticorpos anti-trombina humana feitos em camundongo (1:200), seguido por incubação com anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados com FITC (Isotiocianato de fluoresceína), na diluição de 1:500. Um controle no qual as leptospiros não foram incubadas com trombina foi empregado para se descontar a reatividade cruzada do sistema. Após adição de 1% paraformaldeído às amostras e incubação por 1 hora, estas foram analisadas por citometria de fluxo em FACS Canto II (BD Bioscience).

3.7 Bloqueio da conversão de protrombina em trombina

A ação das leptospiros virulentas sobre a ativação da protrombina em trombina, efetuada pela protease Fator X ativado (Fator Xa), foi verificada por meio de *Western blotting*. Para se determinar o melhor tempo da reação de ativação, foi realizado um ensaio

cinético, no qual protrombina e fator Xa foram coincubados por 0-5 horas e a reação final analisada por SDS-PAGE. Foi selecionado o tempo no qual a maioria da protrombina foi consumida, gerando consequentemente trombina e o respectivo fragmento de ativação.

Diferentes concentrações da cepa virulenta de leptospira L1-130 (5×10^9 a 5×10^7 leptospiras/mL) foram incubadas por 1 hora com protrombina (40 $\mu\text{g/mL}$) e então acrescidas de uma solução contendo Fator Xa (40 nM, Sigma). As incubações foram feitas em tampão contendo Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,3 e CaCl_2 (10 mM). Após 5 horas de coincubação a 37 °C, a reação de clivagem foi parada pela adição de tampão desnaturante para aplicação em gel de poliacrilamida (10% SDS, 50% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 3% β -mercaptoetanol). As frações proteicas foram separadas por SDS-PAGE e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. A detecção da protrombina remanescente bem como dos produtos de ativação foi feita com o uso de anticorpo anti-protrombina (1:2.000), para detecção de protrombina e do fragmento de ativação, ou anti-trombina (1:4.000), para detecção de protrombina e trombina resultante, seguido de incubação com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:3.000). A detecção do sinal quimioluminescente da reação foi feita conforme acima descrito. Como controles, foram usados tratamentos nos quais não foi utilizado fator Xa (sem clivagem) ou leptospiras (clivagem máxima).

3.8 Caracterização da ligação de leptospiras virulentas à trombina

Visando-se avaliar o efeito de diferentes tempos de incubação na interação de leptospiras virulentas com a trombina, *L. interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 (5×10^9 células/mL) foi incubada com 20 U/mL de trombina humana em PBS contendo 0,1% BSA por diferentes tempos (0,5, 1 e 2 horas). A avidéz da ligação do componente à superfície das bactérias foi determinada por meio de lavagem dos *pellets* bacterianos, após interação, com PBS por até 3 vezes. Dose dependência da interação foi analisada por meio da incubação das células de leptospiras com diferentes concentrações de trombina (0-40 U/mL). Para se verificar a especificidade da interação, bem como explorar as possíveis regiões da trombina responsáveis pela ligação, foi feito o seguinte experimento: leptospiras virulentas (5×10^9 células/mL) foram incubadas com uma solução 20 U/mL de trombina humana juntamente com concentrações saturantes dos inibidores de trombina hirudina (50 U/mL, inibidor bivalente, ligante de exosítio I e sítio catalítico), hirugênio (20 μM , porção C-terminal da hirudina, ligante de exosítio I) e argatroban (20 μM , ligante sintético do sítio catalítico). Após

2 horas de incubação a 37 °C, as soluções foram centrifugadas e tanto sobrenadante quanto *pellet* aplicados em gel de poliacrilamida. A detecção da trombina ligada e em solução foi feita por *western blotting*, conforme previamente descrito.

3.9 Detecção de complexos trombina-proteína em soro de pacientes diagnosticados com leptospirose

Uma solução contendo anticorpos anti-trombina (1:500) foi imobilizada em uma placa de ELISA (100 µL/poço) e incubada por 16 horas a 4 °C. As placas foram lavadas e bloqueadas com PBS-T contendo 1% BSA. Então, um *pool* de soro de indivíduos na fase inicial (MAT-), convalescente (MAT+) e normais foi adicionado (1:100). Após 2 horas de incubação, as placas foram lavadas e a detecção de proteínas de leptospira foi feita pela incubação com antissoro anti-bacterina desenvolvido em hamster (1:2.000), seguido de incubação com anticorpo anti-IgG de hamster conjugado com peroxidase (1:5.000), por 1 hora a 37 °C. A reatividade foi detectada com substrato OPD, conforme acima descrito. Foram incluídos controles faltantes de imobilização com anticorpos anti-trombina ou incubação com soro, para se descontar a reatividade basal.

3.10 Avaliação da degradação de protrombina e trombina pelas leptospiros

Protrombina (40 µg/mL) e trombina (20 U/mL) foram incubadas com a cepa virulenta FIOCRUZ L1-130 na concentração de 5×10^9 leptospiros /mL em tampão Tris-NaCl (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,3) contendo 10 mM CaCl₂. Após 5 horas de incubação a 37 °C, as soluções incubadas foram centrifugadas (4.000 x g por 15 minutos) e ambos sobrenadante e *pellet* coletados. As reações foram paradas adicionando-se 0,25 volumes de tampão desnaturante de aplicação em gel de poliacrilamida, seguido por fervura a 96 °C por 10 minutos. Após separação das proteínas em gel de poliacrilamida, estas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, as quais foram incubadas com anti-protrombina (1:2.000) ou anti-trombina (1:4.000). A degradação de trombina também foi verificada em diferentes tampões: PBS, Tris-NaCl e Tris-NaCl contendo 10 mM CaCl₂. Tanto sobrenadante quanto *pellet* após incubação foram avaliados por *wester blotting* por meio de incubação com anticorpos anti-trombina (1:4.000). O efeito da concentração de cálcio sobre a degradação da trombina foi avaliado incubando-se as leptospiros virulentas (5×10^9 /mL) e trombina (20 U/mL) com concentrações crescentes de cálcio (0-10 mM), por 2 horas a 37 °C.

O experimento de degradação da trombina também foi realizado com a cepa saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1, conforme anteriormente descrito.

3.11 Avaliação do efeito de leptospiros recobertas com plasmina sobre as moléculas de protrombina e trombina

Bactérias virulentas *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 (10^9 leptospiros/mL) foram tratadas com 100 μ L de PBS contendo 10 μ g de plasminogênio humano (PLG), 3U uroquinase (uPA) ou ambos PLG e uPA (gerando leptospiros recobertas por plasmina). As células foram lavadas duas vezes com PBS para retirar o excesso de componentes livres. Subsequentemente, as leptospiros foram ressuspensas em 100 μ L de PBS 0,1% BSA contendo protrombina humana (40 μ g/mL) ou trombina (20 U/mL), e as misturas foram deixadas interagir por 7 horas a 37 °C. As suspensões foram separadas por gel de poliacrilamida 12% e as proteínas transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A detecção dos componentes foi feita por meio da incubação com anticorpos anti-trombina (1:4.000).

3.12 Avaliação da formação do coágulo de fibrina em diferentes concentrações de trombina

A fim de se verificar a melhor faixa de concentração de trombina na formação do coágulo de fibrina, diferentes concentrações da enzima foram empregadas, variando de 20 U/mL até 0,6 U/mL. Foram testados tampões contendo ou não BSA (0,1%). Após incubação das diferentes soluções de trombina a 37 °C por 2 horas, 10 μ L foram depositados em placas de ELISA, juntamente com 90 μ L de fibrinogênio humano (1 mg/mL), diluindo-se assim, 10 vezes a concentração original de trombina. O experimento foi feito em triplicata e a formação do coágulo foi monitorada pelo aumento da turbidez das soluções, por leitura no comprimento de onda de 595 nm, em intervalos de 2 minutos. No controle negativo do experimento, trombina foi omitida.

3.13 Avaliação da inibição da atividade da trombina na formação do coágulo de fibrina pelas leptospiros

As bactérias foram recuperadas do meio de cultura a 4.000 x g por 15 minutos, lavadas com PBS e então ressuspensas em PBS contendo 0,1% BSA e 1,25 U/mL de trombina

humana, sendo a concentração celular final de 5×10^9 células/mL. A interação entre as bactérias e a trombina se prolongou por 2 horas a 37 °C. Então, 10 µL das soluções incubadas foram dispostas em placas de ELISA juntamente com 90 µL de uma solução 1 mg/mL de fibrinogênio humano, para formação do coágulo. O experimento foi feito em triplicata e um controle no qual o fibrinogênio foi omitido serviu como monitoramento da sedimentação bacteriana, que poderia levar a uma falsa interpretação da formação do coágulo, que foi acompanhada por leitura no comprimento de onda de 595 nm, em intervalos de 2 minutos. Ao controle negativo do experimento não foi adicionada trombina e em paralelo, foi utilizada uma curva padrão contendo diferentes concentrações da enzima, para que se pudesse comparar a redução da sua atividade causada pelas leptospiros, por regressão linear.

Foi realizado um experimento semelhante para se avaliar a influência dos íons cálcio na redução da atividade da trombina; porém, neste caso, o tampão utilizado para as incubações foi NaCl 150 mM acrescido de 0,1% BSA e diferentes concentrações de CaCl_2 .

3.14 Identificação de bandas reativas com trombina no extrato de leptospiros virulentas

Leptospiros virulentas foram recuperadas do meio de cultura por centrifugação (4.000 x g por 15 min), lavadas duas vezes com PBS e então ressuspensas em PBS acrescido de tampão de aplicação em gel de poliacrilamida. As amostras foram fervidas por 10 min a 96 °C e então aplicadas em gel de poliacrilamida 12%. Foi utilizado um volume que caracterizaria um total de 10^9 células. Após corrida, as proteínas fracionadas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada com uma solução de PBS-T contendo 3% BSA, por 16 horas a 4 °C. Após lavagem com PBS-T, as membranas foram incubadas com solução de trombina humana (40 U/mL) em PBS contendo 0,1% BSA, por 3 horas a 37 °C. Então, a detecção de possíveis bandas reativas foi feita por incubação com anticorpos anti-trombina (1:4.000) seguido de anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:3.000). Em seguida, reagente quimioluminescente foi adicionado, conforme acima descrito.

3.15 Avaliação do efeito de diferentes agentes de *crosslink* sobre a trombina

Trombina humana (10 U/mL) foi incubada com os agentes de *crosslink* hidrossolúveis BS3 (Bis[sulfosuccinimidyl] suberate, 5 mM, Sigma) e glutaraldeído (2%, Sigma) por até 2 horas. Após cada tempo de incubação, as reações foram paradas por meio da adição de Tris-

HCl pH8 (50 mM). As amostras foram fervidas a 96 °C por 10 minutos e submetidas a SDS-PAGE. As proteínas contidas nos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose e a detecção da banda de trombina foi realizada com anticorpos específicos, conforme já descrito.

3.16 Identificação *in silico* de possíveis receptores de trombina

As sequências de aminoácidos contidas no banco de dados do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) foram comparadas com a sequência de aminoácido de um receptor de trombina já descrito, a proteína YopM de *Yersinia pestis* (SKRZYPEK; STRALEY, 1996). Os genes referentes às possíveis proteínas de leptospira que apresentaram similaridade a este receptor foram selecionados para caracterização funcional.

Os genes selecionados estão disponíveis no servidor público: <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/> (NASCIMENTO et al., 2004a). A localização celular das proteínas hipotéticas codificadas por estes genes foi feita pelo uso do programa PSORTb v.3 - <http://www.psорт.org/psортb/> (YU et al., 2011) e CELLO <http://cello.life.nctu.edu.tw/> (YU et al., 2006). A presença de sinal de clivagem ou lipidação foi avaliada com auxílio do programa LipoP - <http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/> (JUNCKER et al., 2003). O peptídeo sinal também foi definido com auxílio do software SignalP - <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.

Os genes foram analisados pelos programas SMART - http://smart.emblheidelberg.de/help/smart_about.html (LETUNIC; DOERKS; BORK, 2015) e PFAM - <http://pfam.sanger.ac.uk/> (FINN et al., 2006) para verificar a presença de domínios conservados.

3.17 Clonagem dos genes LIC10829 e LIC11051

3.17.1 Amplificação dos genes de interesse

Os fragmentos correspondentes aos genes LIC10829 e LIC11051 foram obtidos pela técnica de PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, utilizando-se oligonucleotídeos F (forward) e R (reverse) desenhados com auxílio do programa Generunner® (Hastings Software, Inc - <http://www.generunner.net/>) e tampão de

PCR 1X; 0,2 mM dNTP; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM de cada oligonucleotídeo (F e R); 2,5 U Taq polimerase (todos reagentes acima citados da Invitrogen); 100 ng de DNA genômico. Aos oligonucleotídeos foram adicionados sítios de restrição conforme descrito abaixo. Cabe ressaltar que os sítios de restrição foram escolhidos tendo como critério a ausência dos mesmos na sequência do gene a ser clonado, a fim de garantir a integridade do inserto.

A especificidade da amplificação e o tamanho das sequências de interesse foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA) corado com Gel Red™ (Biotium, Inc). Os insertos de interesse foram cuidadosamente recortados do gel, purificados pelo kit “*GFxPCR DNA and gel band purification*” (GE Healthcare) e os produtos obtidos foram quantificados em espectrofotômetro.

LIC10829F: ATCATC**GGATCC**ACAATTCTTCCTAAGGAAATTGGGC (BamHI)

LIC10829R: ATCATC**GGTACCT**GTCTTGAATCTCGCAAGAAAG (KpnI)

LIC11051F: **GGATCC**ATGAAACACTACCTAACCTTCCAAG (BamHI)

LIC11051R: **GGTACCT**CCCCAAAAGAAACGAGCA (KpnI)

3.17.2 Clonagem no vetor *pGEM-T Easy*

O vetor pGEM-T Easy (Promega) (Figura 7) possui uma quebra de sequência com extremidades 3'T sobressalentes, o que possibilita a ligação do fragmento amplificado, uma vez que algumas polimerase acrescentam uma adenina à extremidade 3' do amplicon, possibilitando o anelamento e posterior ligação do arcabouço açúcar-fosfato. A presença do inserto interrompe o gene LacZ, o qual é essencial para a degradação de um substrato cromogênico, chamado X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo); assim, colônias positivas para o inserto são deficientes para esta degradação, ficando incolores, ao contrario das azuis, as quais degradam o substrato.

A reação de ligação foi realizada segundo a reação padrão estabelecida pelo fabricante. Os produtos de ligação foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* DH5α previamente tornadas competentes pelo método descrito por Hanahan (1983).

Figura 7- Mapa do vetor de clonagem pGEM-T easy.

Representação do vetor pGEM-T *easy* contendo os elementos ori: origem de replicação. Amp^r: gene de resistência a ampicilina. lacZ: gene para metabolismo de lactose (β -galactosidase).
Fonte: Promega.

Para a transformação, foram utilizados 5 μ L do produto de ligação para 50 μ L de bactéria competente, aliquotadas e mantidas em freezer -80 °C, as quais foram descongeladas em gelo. Incubou-se a mistura por 30 minutos em banho de gelo e depois se submeteu a amostra a um choque térmico, por 2 minutos a 42 °C. Retornou-se ao banho de gelo por mais 5 minutos e 350 μ L de meio de cultura Luria Bertani (LB, 0,5% extrato de levedura; 1% triptona; 1% NaCl) foram adicionados. Incubou-se a 37 °C, por 1 hora, sob agitação, sendo a amostra posteriormente plaqueada em meio LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina, 100 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) e 50 μ g/mL de X-gal, sendo estes dois últimos adicionados à placa por meio de espalhamento superficial.

As colônias positivas foram escolhidas por seleção azul/branco, inoculadas em 5 mL de meio LB suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C, sob agitação, por uma noite.

Para obtenção do DNA plasmidial (pGEM-T Easy contendo os insertos de interesse) utilizou-se o kit “*Plasmid prepmini spin*” (GE Healthcare) seguindo as orientações do fabricante. Foi verificada a presença de insertos nos plasmídeos obtidos por eletroforese em gel de agarose, após a digestão dos mesmos com as enzimas de restrição que reconhecem os sítios contidos nas extremidades 5' dos pares de oligonucleotídeos.

3.17.3 Subclonagem no vetor de expressão pAE

Os insertos foram removidos dos plasmídeos recombinantes (pGEM-T Easy/inserto) por digestão com as enzimas de restrição conforme recomendação do fabricante. O vetor de expressão pAE (Figura 8) [pRSETa, modificado por RAMOS *et al.*, (2004)] foi digerido com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para obtenção dos insertos, em tampão que garantia máximo de eficiência para as duas enzimas utilizadas concomitantemente. Após digestão, tanto os insertos quanto o vetor de expressão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e posteriormente purificados pelo kit “*GFX PCR DNA and Gel Band Purification*” (GE Healthcare). O vetor pAE foi desenvolvido para expressar a proteína recombinante contendo 6 resíduos de histidina em sua extremidade N-terminal. Este vetor possui sítio de ligação ao ribossomo (RBS, do inglês *ribosome binding site*), códon ATG de início de tradução, gene de resistência a ampicilina e sinal de terminação de transcrição. É um sistema de alta expressão que é controlado pelo promotor do fago T7, sendo que a expressão da proteína recombinante só ocorre na presença da T7 RNA polimerase, codificada pelas cepas de *E. coli* utilizadas para expressão.

Figura 8- Mapa do vetor de expressão pAE.

Esquema do vetor pAE com os elementos P_{T7}: promotor. (His)_{6x}: sequência codificadora para seis resíduos de histidina. RBS: sítio de ligação ao ribossomo. ATG: códon de início da transcrição. Term: região de terminação de transcrição (T7). F1ori: origem de replicação. Amp^R: gene de resistência à ampicilina.

Os fragmentos referentes aos genes LIC10829 e LIC11051 foram inseridos no vetor pAE digerido. A ligação dos insertos ao vetor foi realizada em uma reação contendo inserto:vetor em uma proporção molar de 1:1. Incubou-se o inserto unido ao vetor por 10 minutos a uma temperatura de 65 °C seguido de incubação em banho de gelo por 5 minutos.

Acrescentaram-se 5 U de T4 DNA ligase (Amersham Pharmacia Biotech, Inc) e incubou-se por 16 horas a 16 °C.

Bactérias competentes *E. coli* DH5 α foram transformadas com os produtos de ligação, semeadas em LB/Amp e incubadas a 37 °C por uma noite. As colônias selecionadas foram então inoculadas em 5 mL de meio de cultura com 100 μ g/mL de ampicilina e incubadas a 37° C, sob agitação, por uma noite. Para a seleção dos clones recombinantes, 300 μ L dos inóculos foram centrifugados a 8.000 x g, por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 50 μ L de água deionizada. Adicionaram-se 20 μ L de tampão de carregamento 10X (0,19% azul de bromofenol, 0,425 xileno cianol e 50% glicerol) e 28 μ L de solução fenol-clorofórmio 1:1 (v/v). A amostra foi então homogeneizada com o auxílio do *vortex*.

A amostra foi centrifugada a 8.000 x g, por 3 minutos e a fase superior foi analisada por eletroforese de gel de agarose 1%. A obtenção do DNA plasmidial (pAE/inserto) e a verificação da presença dos insertos foi feita da mesma maneira descrita para o vetor pGEM-T Easy.

3.17.4 Sequenciamento dos clones

Preparações plasmidiais dos clones positivos foram obtidas e o DNA foi submetido a sequenciamento pelo método da terminação de cadeia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), a partir dos oligonucleotídeos T7 e pAER (abaixo), utilizando-se sequenciador automático ABI (PE Applied Biosystems, Foster city, CA) para a verificação dos insertos clonados.

Conforme recomendação da Applied Biosystems, a reação de amplificação dos fragmentos a serem sequenciados foi realizada num volume final de 20 μ L contendo DNA molde 100 ng, 3,2 pmoles de oligonucleotídeo e 2 μ L do tampão *BigDye*® (Applied Biosystems) que contém: ddNTPs marcados com corantes fluorescentes específicos, dNTPs e Taq DNA polimerase. A reação foi realizada em termociclador seguindo a rotina de 40 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 52 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 minutos. A seguir, a mistura foi precipitada com isopropanol 75% e centrifugada 50 minutos a 11.500 x g a temperatura ambiente.

O precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, seco a vácuo em centrífuga e ressuspensionado para aplicação em 15 μ L de formamida HiDi (Applied Biosystems). Os

cromatogramas obtidos foram analisados com o auxílio dos programas públicos: Chromas (<http://www.mb.mahidol.ac.th/pub/chromas/chromas.htm>) e Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) (ALTSCHUL et al., 1990).

T7 “forward” TAATACGACTCACTATAGGG

pAER reverso: CAGCAGCCAACTCAGTTCCT

3. 18 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

3.18.1 Estudo de indução das proteínas recombinantes

A cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS foi empregada para ensaios de expressão; para tal, as bactérias competentes foram transformadas com o plasmídeo recombinante conforme já mencionado e cultivadas em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol. A temperatura de incubação foi de 37 °C e a indução foi realizada adicionando-se 0,01; 0,1 e 1 mM de IPTG e incubando-se as culturas, novamente, à mesma temperatura por um período de 3 horas. A seguir as bactérias foram centrifugadas (3.200 x g, 15 minutos a 4 °C) e os sedimentos ressuspensos em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8; 200 mM NaCl; 200 µg/mL lisozima; 2 mM PMSF e 1% Triton X-100). As bactérias foram então lisadas em banho de gelo por sonicação e centrifugadas novamente. Os sedimentos formados nesta etapa foram ressuspensos em tampão de desnaturação (10 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 8 M uréia; 5 mM β-mercaptoetanol), e alíquotas do sobrenadante da sonicação e do sedimento solubilizado foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS.

3.18.2 Ensaio de Western blotting para confirmação da expressão das proteínas recombinantes

As proteínas a serem avaliadas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose “Hybond-ECL” (GE Healthcare) em sistema semi-úmido (GE) por 1 hora a 0,8 mA por cm² em Tris-Glicina acrescido de 1,85% de SDS (tampão de transferência). A eficiência da transferência foi avaliada por coloração de *Ponceau S* (Sigma). As proteínas foram descoradas com PBS-T sob agitação e a membrana foi então incubada

com solução de bloqueio (PBS-T contendo leite em pó desnatado 10%) durante uma noite a temperatura de 4 °C.

Lavou-se a membrana por 15 minutos com PBS-T e logo após a mesma foi incubada com anticorpo monoclonal anti-polihistidina (anti-his) conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:5.000. Lavou-se novamente a membrana por 15 minutos com PBS-T, e as frações detectadas utilizando kit ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare). A quimiluminescência da reação da peroxidase foi detectada conforme acima mencionado.

3.18.3 Purificação e diálise das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes (rLIC10829 e rLIC11051) foram purificadas na bancada pela técnica de cromatografia de afinidade ao metal, com uso de coluna Sepharose impregnada com níquel. A purificação partiu de 400 mL de cultura de *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS, cujo sobrenadante resultante após sonicação foi diluído em tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8 e 500 mM NaCl (1:5) e passado na coluna para purificação, em um fluxo de 2 mL por minuto. A resina *Chelating Sepharose* (GE Healthcare) previamente carregada com Ni²⁺ foi equilibrada com tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl e carregada com o volume do sobrenadante diluído. Após 4 lavagens (30 mL) com o tampão descrito acima, porém com concentrações crescentes de imidazol de 5 mM, 20 mM, 40 mM e 60 mM respectivamente, a proteína foi eluída com a concentração de 1 M de imidazol.

As frações de todas as etapas da purificação foram coletadas e analisadas em gel de SDS-PAGE. As alíquotas que continham as proteínas recombinantes foram dialisadas em PBS 0,01% glicina a 4 °C, sendo realizadas quatro trocas do tampão. A concentração da proteína recombinante foi estimada em SDS-PAGE pela comparação de suas bandas com bandas contendo massas conhecidas de BSA.

3.19 Screening de adesão de proteínas recombinantes com trombina

Trombina humana foi diluída em PBS (10 U/mL) e a cada poço de uma placa de ELISA foi adicionado 1 U da mesma para imobilização. Após esse período, as placas foram lavadas, e então foram bloqueadas com PBS-T acrescido de 1% BSA; as placas foram incubadas a 4 °C por 16 horas. A solução de bloqueio foi descartada, as placas lavadas e a cada poço foi adicionado 1 µg de cada proteína recombinante disponível em nosso

laboratório, em 100 μ L de PBS. A interação entre componente e proteína foi estendida por 2 horas a 37 °C, as placas foram lavadas seis vezes e a detecção das proteínas recombinantes ligadas foi feita pela adição de anticorpo monoclonal anti-His conjugado com peroxidase, empregado em uma diluição que apresentou OD_{492 nm} igual a 1 nos experimentos de titulação, em 100 μ L de PBS. As placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C. A reação foi revelado com substrato OPD conforme mencionado anteriormente.

Para as análises estatísticas, a média dos valores de absorbância de cada componente foi comparada com as médias apresentadas pelos controles negativos, pelo teste t-Student, e o um p-valor abaixo de 0,05 (5%) foi considerado estatisticamente significativo. O p-valor apresentado nos resultados se refere ao controle negativo BSA.

3.20 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes à trombina

Foi avaliada a especificidade da interação entre as proteínas recombinantes e a trombina, a qual foi pré-incubada ou não com o competidor bivalente hirudina (10 U/mL). À trombina imobilizada (1 U/poço) foram adicionados 100 μ L de uma solução contendo proteína recombinante (10 μ g/mL). A detecção da ligação das proteínas à trombina imobilizada foi realizada por meio da incubação com anticorpos monoclonais anti-his, conforme descrito. A ligação das proteínas à trombina pré-incubada com hirudina foi comparada com o máximo de ligação, ou seja, sem a incubação com o inibidor de trombina.

3.21 Efeito da incubação dos ligantes de trombina na atividade da mesma

As proteínas recombinantes utilizadas foram dialisadas em tampão PBS por 2 horas a 4 °C. Trombina humana (1,25 U/mL) foi incubada com 2 μ M de cada proteína por 2 horas a 37 °C. Como controle, foi feita uma curva padrão com concentrações decrescentes da enzima, diluída em tampão recuperado dos frascos de diálise, para que houvesse máxima padronização do experimento. Dez μ L das soluções foram dispostos em uma placa de ELISA, juntamente com 90 μ L de uma solução de fibrinogênio humano (1 mg/mL, PBS). A reação de formação do coágulo se prolongou por 1 hora, sendo feitas leituras de 2 em 2 minutos, no comprimento de onda de 595 nm. O experimento foi realizado em triplicata e foi incluída uma curva padrão de diferentes concentrações de trombina imobilizada, para se inferir a redução causada pela

incubação com as proteínas recombinantes. Um controle negativo desprovido de trombina também foi incluído.

3.22 Efeito da incubação da trombina com soro de pacientes na geração do coágulo de fibrina

Trombina humana (1,25 U/mL) foi incubada por 2 horas a 37 °C com *pool* soro de pacientes na fase inicial (MAT-) e convalescente (MAT+) da doença, diluídos 40 vezes. Como controle, foi utilizado um *pool* de soros saudáveis não reativos com leptospirose. Após, 10 µL da solução foram dispostos em placas de ELISA, juntamente com 90 µL de uma solução contendo fibrinogênio (1 mg/mL) e a formação do coágulo foi medida conforme acima descrito.

3.23 Detecção de antitrombina em soro de pacientes

Em um gel de poliacrilamida 12% foram aplicados 0,25 µL de diferentes *pools* ou amostras individuais de soro normal saudável, MAT- e MAT+. As proteínas fracionadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada com uma solução de PBS-T 1% BSA por 16 horas, a 4 °C. A detecção de antitrombina foi feita por meio de incubação de anticorpos específicos (Sigma, 1:3.000 em PBS-T 1% BSA), seguida de incubação com anti-IgG de coelho (1:3000). Como controle positivo, foi utilizada antitrombina (1 µg) purificada de plasma humano (Sigma). A detecção das bandas reativas foi feita pela utilização de substrato quimioluminescente, conforme acima descrito.

3.24 Avaliação da interação das leptospiplas com antitrombina

Diferentes cepas de *Leptospira* (5×10^9 células/mL) foram incubadas com 100 µL de PBS contendo 1 µg de antitrombina por 2 horas a 37 °C. As misturas foram centrifugadas a $4.000 \times g$ por 15 minutos e submetidas a SDS-PAGE (12%) da seguinte maneira: sobrenadante, *pellet* e *pellet* após lavagem com 1 mL de PBS. As proteínas fracionadas foram transferidas para membranas de nitrocelulose para detecção da banda de antitrombina III por *western blotting*, conforme descrito, utilizando-se anticorpos específicos.

3.24 Influência de íons cálcio sobre a interação das leptospiros com antitrombina

Antitrombina (10 µg/mL) foi incubada com 10^9 células/mL da cepa virulenta *L. interrogans* sorovar Copenhageni FIOCRUZ L1-130 em tampão PBS, Tris-NaCl (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8.3) ou Tris-NaCl contendo 10 mM CaCl_2 . Após 16 horas de incubação à temperatura ambiente, as soluções foram centrifugadas ($4.000 \times g$ por 15 minutos), e ambos sobrenadante e *pellet* coletados para avaliação. As reações foram interrompidas pela adição de 0,25 volumes de tampão de aplicação SDS-PAGE às amostras, seguido de fervura por 10 minutos. As proteínas foram separadas por corrida em gel de poliacrilamida e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose, na qual foram incubadas com anticorpos anti-antitrombina (1:3.000), seguido de anticorpos anti-IgG de coelho conjugados com peroxidase (1:4.000).

3.25 Efeito da plasmina ligada às leptospiros sobre antitrombina

Células de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 (10^9 leptospiros/mL) foram tratadas com 100 µL de PBS com adição de 10 µg de plasminogênio (PLG), 5 µg de uroquinase (uPA) ou ambos (gerando plasmina, PLA, na superfície das bactérias). Controles faltando algum ou ambos os componentes foram empregados. As bactérias foram incubadas por 2 horas a 37 °C com PLG, e por mais 2 horas após a adição de uPA. As células foram lavadas duas vezes com PBS para remoção do PLG, uPA ou PLA livres. Então, as leptospiros foram ressuspensas em 100 µL de PBS contendo antitrombina (10 µg/mL) e as misturas foram deixadas interagindo por 16 horas à temperatura ambiente. As suspensões foram separadas por SDS-PAGE 12% e as proteínas fracionadas transferidas para membrana de nitrocelulose. A detecção do componente em estudo foi feita conforme acima descrito, por meio da utilização de anticorpos anti-antitrombina (1:3.000).

3.26 Avaliação da atividade inibitória de soro de hamsters infectados com *Leptospira* sobre a atividade da trombina

Hamsters sírios machos recém-desmamados foram infectados intraperitonealmente com *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm (LPF) e sorovar Canicola cepa LO4 (10^4 células/animal). Os animais foram sangrados pelo plexo reto-orbital em diferentes dias de infecção. Os animais são mantidos no biotério do Laboratório de Zoonoses

Bacterianas, localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Os animais receberam água e alimento *ad libitum*. As amostras foram processadas e o soro dos animais coletados após centrifugação a 3.200 x g por 5 minutos, para separação do coágulo. Os soros foram diluídos 40 X e então incubados com trombina humana (1 U/mL) em tampão PBS contendo 0,1% BSA, por 2 horas a 37 °C. Dez µL das misturas foram dispostos em placas de ELISA juntamente com 90 µL de uma solução contendo 1 mg/mL de fibrinogênio humano. A reação de formação do coágulo procedeu-se por 1 hora. Foi utilizada uma curva padrão contendo diferentes concentrações de trombina e um controle desprovido da mesma foi incluído. Este experimento se sustenta nos dados experimentais que mostraram que os inibidores de trombina de hamsters são capazes de inibir trombina humana (MAK; ENGHILD; DUBIN, 1996).

3.27 Detecção de protrombina em soro de pacientes e hamsters infectados

Um µL de amostra de soro humano (normal, MAT- e MAT+) ou de hamster (em diferentes momentos da infecção com cepa virulenta de *Leptospira*) foi diluído em 50 µL de PBS contendo FXa (40 nM), para a conversão da protrombina do soro em trombina. Após 1 hora de incubação a 37 °C, 50 µL do substrato cromogênico para trombina (N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide hydrochloride, 0,5 mM, Sigma) foram adicionados à mistura e então os 100 µL totais foram dispostos em uma placa de ELISA para leitura da densidade ótica a 405 nm após 20 minutos de incubação a 37 °C. Foram empregados controles sem FXa, substrato ou amostra de soro, e nestes casos, o volume da reação foi completado com PBS. Os experimentos foram realizados em triplicata. A detecção de protrombina em soros humanos também foi realizada por meio de *western blotting*, conforme descrito anteriormente. Em suma, proteínas contidas em 0,25 µL de amostras de soro humano foram separadas por SDS-PAGE e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A detecção de protrombina e de seu fragmento de ativação (F1+2) foi feita utilizando anticorpos anti-F2 (1:3.000, em PBS-T contendo 1% leite).

3.28 Quantificação de PAI-1 em soro de pacientes com leptospirose

A detecção e quantificação de PAI-1 em amostras de soros de pacientes com leptospirose foram feitas utilizando-se o *Human PAI-1 ELISA Kit* (Sigma). Brevemente, um

pool de amostras de indivíduos saudáveis ou acometidos por leptospirose (fase inicial e convalescente) foi diluído 100X e incubados em placa de ELISA na qual anticorpo de captura anti-PAI-1 havia sido pré-imobilizado. Juntamente às amostras, foi utilizada uma curva padrão contendo diferentes concentrações do componente em estudo. Após 2 horas de incubação, a placa foi lavada 3 vezes e então incubada com o anticorpo de detecção conjugado à biotina por mais 1 hora. A seguir, a presença do componente foi indiretamente medida pela incubação com estreptoavidina conjugada à peroxidase e adição de substrato cromogênico TMB.

3.29 Inativação das leptospiros por paraformaldeído

Diferentes cepas de *Leptospira* foram contadas, centrifugadas (4.000 x g, 15 minutos) e o *pellet* resultante lavado duas vezes com solução PBS; em seguida, o sedimento bacteriano foi ressuspensionado em PBS 2% paraformaldeído e a incubação procedeu-se por 1 hora. A confirmação da total eficiência da inativação química das leptospiros foi realizada por meio da observação da solução em microscópio, para se verificar a ausência de bactérias viáveis, bem como inoculação em meio líquido. As bactérias foram contadas e diluídas para a concentração final de 1×10^8 /mL.

3.30 Avaliação da inflamação desencadeada por diferentes cepas de *Leptospira* spp. em esplenócitos murinos

Camundongos BALB/c (45 dias) foram eutanasiados em CO₂ e seus baços foram assepticamente removidos e depositados em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium-RPMI-1640, contendo 2 mM L-glutamina). Os baços foram macerados com auxílio de um *porter* e centrifugados por 10 minutos a 160 x g, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e à fase sedimentada foi adicionado 1 mL de água gelada estéril, para lise dos eritrócitos; após este procedimento, as suspensões foram novamente centrifugadas.

O sobrenadante resultante foi descartado e os esplenócitos foram ressuspensionados em 1 mL de RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram contadas após marcação com 0,4% azul de tripano e então distribuídas em triplicata em uma placa de cultura celular de 96 poços (Costar, Corning), na quantidade de 5×10^5 células/poço.

Os esplenócitos foram tratados com 5 µg/mL do mitógeno Concanavalina A (ConA, Sigma), empregado como controle positivo de proliferação, leptospiros inativadas em um

M.O.I (multiplicidade de infecção) de 100 ou apenas meio (ausência de estímulo), sendo este tratamento empregado como controle negativo de proliferação. As células foram incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% CO₂, sendo então o estímulo com as leptospiros adicionado por 2, 4, 8 e 16 horas, representando um total de 40 horas total de cultura celular, em atmosfera umidificada, e a taxa de proliferação celular foi determinada em função da replicação do DNA, medida pela incorporação de bromodesoxiuridina (BrdU), um análogo de base nitrogenada timina, por um kit de ELISA colorimétrico-BrdU (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN).

Após os estímulos, as células foram incubadas por 2 horas com BrdU para permitir a marcação do DNA genômico. Em seguida, anticorpo anti-BrdU conjugado com peroxidase (1:100) foi adicionado e as células incubadas por 90 minutos; solução de substrato para a enzima foi adicionada e foi feita incubação a temperatura ambiente por 15 minutos; a reação enzimática foi parada pela adição de H₂SO₄ 1M e a densidade ótica foi medida a 450 nm.

Para análise das citocinas secretadas, as células do baço foram extraídas segundo protocolo acima descrito. A cultura dos esplenócitos foi feita em placa de cultura celular de 24 poços, cada qual contendo 5 x 10⁶ células, em triplicata. Após os diferentes tempos de infecção, a placa foi centrifugada e o sobrenadante resultante da cultura celular foi coletado e armazenado em curto prazo a -20 °C. As citocinas IL-12, IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α foram medidas por ELISA sanduíche (PreproTech, Colonia Narvarte, Mexico), de acordo com as instruções do fabricante. Em suma, o anticorpo de captura foi imobilizado a placa de ELISA durante cerca de 16 horas, a placa foi lavada e bloqueada com solução de bloqueio por 1 hora.

Os padrões de citocinas foram diluídos para compor uma curva de concentração. Então, 100 µL de cada sobrenadante foram adicionados a cada poço, e a placa foi incubada por 2 horas a 37 °C. Foi adicionado o anticorpo de detecção (1:2.000), seguido por 2 horas de incubação; o substrato ABTS foi adicionado a cada poço e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. As leituras colorimétricas foram feitas no comprimento de onda de 405 nm, e os valores de absorbância foram convertidos em valores de concentração mediante comparação com a curva de concentrações gerada.

As análises estatísticas foram realizadas dentro de um mesmo grupo, para se avaliar a diferença em diferentes tempos de estímulo, e entre os grupos, para se avaliar o diferencial de proliferação ou liberação de citocinas induzido por cada cepa de *Leptospira*, por meio do teste estatístico ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

3.31 Preparo de bacterinas para imunização em hamsters

Diferentes cepas de *Leptospira* foram contadas, centrifugadas (4.000 x g, 15 minutos) e o *pellet* resultante lavado duas vezes com solução PBS; em seguida, o sedimento bacteriano foi ressuspensionado em um volume de PBS que acarretaria em uma concentração final de 5×10^9 leptospiras/mL. A solução de leptospiras foi incubada a 56 °C durante 30 minutos para inativação das mesmas, sendo a confirmação da total eficiência deste procedimento realizada por meio da observação da solução em microscópio, para se verificar a ausência de bactérias viáveis. Adicionalmente, 1 mL da solução foi adicionado ao meio EMJH, para se verificar a ausência de crescimento das bactérias após uma semana.

3.32 Avaliação do efeito da inflamação por cepas de *Leptospira* spp. sobre a sobrevivência de hamsters após desafio heterólogo

Grupos de seis hamsters machos recém-desmamados foram imunizados duas vezes, pela via subcutânea, com bacterinas produzidas a partir das cepas de *L. interrogans* sorovares Pomona Fromm (LPF) e Canicola (LO4), totalizando a quantidade de 10^9 leptospiras por animal, em intervalos de duas semanas. Como controle, foi empregado um grupo de animais injetados com solução salina. Transcorridas mais duas semanas após a última imunização, os animais foram inoculados intraperitonealmente com uma dose sub-letal de leptospiras (próxima a DL50) definida por experimentos de curva de sobrevivência. No decorrer do experimento, os animais receberam comida e água *ad libitum*, sendo monitorados por 21 dias e eutanasiados à medida que exibissem sinais de leptospirose fulminante, como perda de peso, prostração e sangramento no trato urinário.

3.33 Efeito da administração de anti-inflamatório corticoide sobre a sobrevivência e sintomatologia de hamsters desafiados com cepa virulenta de *Leptospira*

Hamsters machos (n=6, aproximadamente 100 g cada animal) receberam uma dose de 1,25 mg/kg de anti-inflamatório dexametasona (Dextar, fosfato dissódico de dexametasona) pela via intraperitoneal em diferentes esquemas: um dia antes do desafio, imediatamente após o desafio ou quatro dias após o desafio. Os animais foram desafiados com a cepa virulenta e hemorrágica *L. interrogans* sorovar Canicola LO4 (10^4 leptospiras/animal) e

acompanhados quanto à evolução dos sintomas. Após a infecção, diariamente os animais receberam a mesma dose de anti-inflamatório e para o grupo controle (n=6) foi administrada diariamente uma solução salina, também pela via intraperitoneal. Os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital em diferentes dias para monitoramento dos parâmetros séricos de interesse; durante o experimento, os animais receberam comida e água *ad libidum*, sendo monitorados e eutanasiados à medida que exibissem sinais de leptospirose fulminante, sendo então feita uma autópsia para verificação de focos hemorrágicos e verificação da presença de sangramento no trato urinário. Durante o experimento, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP. Os experimentos para detecção da presença de protrombina e inibidores de trombina foram realizados conforme acima descrito.

3.34 Detecção de Fator Tissular em amostras de hamsters infectados

A detecção de FT em amostras de soro de hamsters infectados foi realizada com utilização de um kit de ELISA sanduíche (MyBioSource, British Columbia). Em suma, foram adicionados 50 µL das amostras de interesse por poço de uma placa de ELISA, na qual previamente anticorpos de captura anti-FT haviam sido imobilizados. Imediatamente, foram adicionados 100 µL da solução de anticorpos de detecção conjugado com peroxidase, sendo os 150 µL totais incubados por 1 hora a 37 °C. A placa foi lavada 4 vezes e 100 µL da solução de substrato, fornecida pelo kit, foram adicionados, sendo a revelação mantida por 15 minutos, parada com 50 µL de H₂SO₄ 2M e as soluções lidas no comprimento de onda de 420 nm. Em paralelo, foram utilizadas soluções com diferentes concentrações do antígeno de interesse, compondo uma curva padrão utilizada para os cálculos das concentrações séricas de FT nas amostras. O experimento foi realizado em duplicata.

Para o cálculo do aumento relativo nas concentrações séricas de FT, foi empregada a seguinte fórmula: $\text{Aumento} = (C_f - C_i) / C_i$, na qual C_f e C_i referem-se às concentrações finais e iniciais, respectivamente.

3.35 Geração de *L. biflexa* recombinante expressando LIC11360 (Lsa23)

3.35.1 Determinação do sítio de início de transcrição no gene *lipI32* por 5'RACE

3.35.1.1 Extração de RNA

Trinta mL de cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni na fase exponencial foram coletados por centrifugação (4.000 x g por 15 minutos) em tubos livres de RNase e o *pellet* resultante foi ressuscitado em 1 mL de reagente Trizol (Invitrogen), a solução vigorosamente agitada e então incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 260 µL de clorofórmio foram adicionados e então a mistura incubada novamente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C para separação em fase orgânica e aquosa; a fase aquosa foi cuidadosamente coletada, transferida para novo tubo e 660 µL de isopropanol foram adicionados para precipitação dos ácidos nucleicos, por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados (12.000 x g por 10 minutos, 4 °C) e o *pellet* resultante lavado com 1,35 mL de uma solução 75% etanol. Após centrifugação, o sobrenatante foi removido e o *pellet* mantido por cerca de uma hora à temperatura ambiente para evaporação da solução residual, sendo então finalmente ressuscitado em 44 µL de água livre de RNase e incubado a 55 °C por 10 minutos.

DNA remanescente foi eliminado por incubação com Turbo DNase (Invitrogen), da seguinte maneira: 44 µL de amostra de RNA, 5 µL de 10 X *Turbo Dnase buffer* e 1 µL de Turbo Dnase. A incubação ocorreu por 30 minutos a 30 °C e então a enzima foi inativada pela adição de 5 µL de *DNase Inactivation Reagent* e incubação por 5 minutos; após centrifugação, RNA foi recuperado e transferido para novo tubo. A qualidade das amostras foi verificada por Nanodrop (Thermo Scientific).

3.35.1.2 Síntese de cDNA com oligonucleotídeo específico para lipL32

Para geração de cDNA para subsequente amplificação por PCR, 1 µg de RNA total foi incubado com 2,5 pmol de GSP1 (*gene specific primer* 1) em um volume final de 15,5 µL em água tratada com DEPC. A mistura foi incubada por 70 °C por 10 minutos para desfazer qualquer estrutura secundária no RNA que poderia prejudicar a reação de síntese de cDNA; após resfriamento em gelo por um minuto, tampão de PCR (concentração final 1X), MgCl₂ (2,5 mM), dNTP (400 µM) e DTT (10 mM) foram adicionados à reação. As misturas foram incubadas a 42 °C por 1 minuto e então 200 U da enzima SuperScript II RT (Invitrogen) foram adicionadas para a reação de transcrição reversa, durante 50 minutos a 42 °C. A enzima foi inativada a 70 °C por 15 minutos e RNA restante na reação (livre ou em heteroduplex

mRNA-DNA) foi degradado pela incubação com 1 µL de *RNase Mix* (Thermo Scientific) por 30 minutos a 37 °C.

3.35.1.3 Adição de cauda homopolimérica, PCR e sequenciamento

O cDNA gerado foi purificado da reação por purificação em coluna com *QIAquick PCR Purification Kit*, sendo eluído no volume final de 30 µL. Como o final 5' do RNAm (e consequentemente a extremidade 3' do cDNA gerado) é desconhecido, uma cauda homopolimérica é adicionada para que a reação de PCR possa ser realizada. Dez µL do cDNA purificado foram misturados com 200 µM dCTP, 1X *tailing buffer* (fornecido no kit 5' RACE System) e enzima TdT (transferase terminal) em um volume final de 24 µL, incubados a 94 °C por 3 minutos e a reação de acréscimo de cauda transcorreu por 10 minutos a 37 °C, sendo a enzima inativada a 65 °C por 10 minutos ao final da reação.

Para a reação de PCR, 5 µL da reação anterior foram adicionados, juntamente com tampão de reação 1X, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 400 nM do oligonucleotídeo GSP2 (*gene specific primer 2*, localizado à 3' da sequência reconhecida por GSP1) e 400 nM do oligonucleotídeo AAP (*Abridged Anchor primer*, complementar à cauda homopolimérica, fornecido no kit) e 2,5 U de Taq polimerase. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% e então 4 µL dos mesmos foram ligados a 1 µL do vetor de clonagem pGEM-T easy.

Cepas de *E. coli* DH5α foram transformadas com 5 µL do produto de ligação por choque térmico, conforme descrito anteriormente. Após transformação, colônias contendo os plasmídeos recombinantes foram selecionadas em placas LB contendo X-gal, por seleção azul/branco, crescidas em meio líquido para extração plasmidial, visando confirmação da presença do inserto por digestão enzimática com EcoRI. Clones confirmadamente positivos foram enviados para sequenciamento, sendo que o primeiro nucleotídeo após a cauda homopolimérica é considerado o sítio de início de transcrição.

3.35.2 Amplificação e clonagem do gene LIC11360 (*Lsa23*) contendo promotor intrínseco e promotor do gene *lip132*

Os fragmentos de interesse referentes ao gene LIC11360 foram obtidos por PCR com os oligonucleotídeos descritos abaixo, visando incluir ambos promotores e terminadores de transcrição nos *amplicons*. Em adição, foi empregado oligonucleotídeo *forward* contendo a

sequência promotora do gene *lipL32* à sua extremidade 5', com o objetivo de fusionar geneticamente este promotor forte e constitutivo ao CDS do gene LIC11360. A especificidade da amplificação foi verificada por visualização em gel de agarose 1%.

Para clonagem dos fragmentos de PCR, o vetor pGEM-T Easy foi utilizado. A reação de ligação foi realizada segundo a reação padrão estabelecida pelo fabricante. Os produtos de ligação foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* DH5α competentes.

Para obtenção do DNA plasmidial (pGEM-T Easy contendo o inserto de interesse) utilizou-se o kit “*Plasmid prepmini spin*” (GE Healthcare) seguindo as orientações do fabricante. Foi verificada a presença de insertos nos plasmídeos obtidos, por eletroforese em gel de agarose, após a digestão dos mesmos com as enzimas de restrição que reconhecem os sítios contidos nas extremidades 5' dos pares de oligonucleotídeos.

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados para construção de mutantes

Construção	Sequência*	Enzima
Lsa23F	<u>CGAGCTCT</u> CACTCCTTGAAATGCCGAT	SacI
Lsa23R	CTAGT <u>CTAGAGT</u> GTAACAAAGATGAGAACC	XbaI
pLipL32:Lsa23F	<u>CGAGCTCAAATTATTCAATATTGATTTACA</u> AAAAATTCCTAAGTTCATACCGTGATTTT CCTAACTAAGGAGAGTCTATGTTAAGTTG TAAAACACG	SacI
pLipL32:Lsa23R	CTAGT <u>CTAGAGT</u> GTAACAAAGATGAGAACC	XbaI

* As sequências sublinhadas se referem aos sítios de restrição e em negrito ao promotor do gene *lipL32*.

3.35.3 Subclonagem no *suttle* vector *E. coli*/L. *biflexa* pMaOri

O gene contendo os diferentes promotores foi removido dos plasmídeos recombinantes por digestão com as enzimas de restrição; o vetor de expressão pMaOri (PAPPAS; BENAROUDJ; PICARDEAU, 2015) (Figura 9), replicativo tanto em *E. coli* quanto em cepas saprófitas e patogênicas de *Leptospira*, foi digerido com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para obtenção do inserto, em tampão que garantia máximo de eficiência para as duas enzimas utilizadas. Após digestão, tanto os insertos quanto o vetor de expressão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e posteriormente purificados pelo kit “*GFX PCR DNA and Gel Band Purification*” (GE Healthcare).

A ligação do inserto ao vetor foi realizada em uma reação contendo inserto:vetor variando de 1:1 até 1:20 e T4 DNA ligase. Bactérias competentes *E. coli* $\pi 1$ foram transformadas com os produtos de ligação, semeadas em placas LB contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de espectinomicina (marca de seleção do vetor pMaOri) e 300 μM dT (cepa $\pi 1$ é auxotrófica para dT) e incubadas a 37 °C por uma noite.

As colônias selecionadas foram então inoculadas em 5 mL de meio de cultura com 100 $\mu\text{g/mL}$ de espectinomicina e 300 μM dT e incubadas a 37 °C, sob agitação, por uma noite. Para a seleção dos clones positivos para a inserção das construções de interesse, os plasmídeos foram purificados e digeridos com as enzimas de restrição utilizadas nas extremidades dos oligonucleotídeos, para verificação da liberação do inserto.

Figura 9- Plasmídeo pMaOri

Plasmídeo replicativo em cepas de *Leptospira*, contendo origem de replicação R6Kg, marca de resistência ao antibiótico espectinomicina, origem de conjugação e origem de replicação em *Leptospira*.

3.35.4 Conjugação entre *E. coli* recombinante e *L. biflexa*

Os plasmídeos recombinantes foram usados para transformar a cepa conjugativa *E. coli* $\beta 2163$, por choque térmico. Estas bactérias foram crescidas em meio EMJH contendo 0,3 mM DAP (ácido diaminopimélico) até uma densidade óptica de 0,3 a 420 nm, enquanto que a cepa saprofítica *L. biflexa* foi incubada a 30 °C até atingir a fase exponencial ($\text{DO}_{420\text{nm}}$ de aproximadamente 0,3) em meio EMJH. Tanto *E. coli* quanto *L. biflexa* foram concentradas com filtração sobre um filtro de acetato-celulose de 0,1 μm . Brevemente, o filtro foi disposto

na parte superior de um aparato de filtração, sobre o qual foi colocado um funil mantido unido por ação de uma pinça; 0,5 mL de cultura de *E. coli* foi dispensada no funil e concentrada sobre a superfície do filtro, por pressão negativa, e então 5 mL de cultura de leptospira foram acrescentados. Após secagem, o filtro foi cuidadosamente retirado do aparato e colocado em placas EMJH suplementadas com DAP, as quais foram incubadas por 16 horas a 30 °C. Após incubação, o filtro foi removido da placa e colocado em tubos de 15 mL contendo 1 mL de meio EMJH; então, as bactérias foram recuperadas por pipetagem, espalhadas em placa EMJH suplementadas com espectinomicina (50 µg/mL) e incubadas por 1 semana até que as colônias estivessem visíveis. As colônias foram ensaiadas quanto a presença dos plasmídeos recombinantes por PCR, visando-se a amplificação do gene de resistência à espectinomicina contido no vetor pMaOri. Células de *E. coli* β2163, que são auxotróficas para DAP, são eliminadas neste plaqueamento.

3.35.5 Validação da expressão do gene de interesse por RT-PCR e qPCR

Para obtenção de cDNA, o kit *iScript cDNA synthesis* (Biorad) foi empregado: dois µL de RNA total extraído das culturas de interesse foram colocados em contato com 4 µL de 5 X *iScript reaction mix* e 1 µL da enzima transcriptase reversa *iScript*, em um volume final de 20 µL. As reações foram incubadas a 25 °C por 5 minutos, seguido de incubação a 42 °C por 45 minutos e então 5 minutos a 85 °C para inativação da enzima. Um controle no qual a enzima foi omitida foi empregado para se averiguar a contaminação por DNA genômico nas amostras (RT-).

A presença de RNAm referente ao gene LIC11360 foi indiretamente verificada por amplificação das amostras de cDNA, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o gene. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%. Como controle positivo e negativo de amplificação, DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e *L. biflexa* sorovar Patoc foram utilizados, respectivamente.

Real time PCR (RT-qPCR) foi realizado utilizando-se o aparelho Applied Biosystems 7300 e SYBR *green* para detecção de DNA dupla fita sintetizado. As reações foram realizadas em volume final de 20 µL contendo 1 µL da reação de síntese de cDNA como molde, 200 nM de cada oligonucleotídeo (F e R) e 10 µL de *SsoFast EvaGreen supermix*, de acordo com recomendação do fabricante. Todas as reações foram realizadas em triplicata em placas de 96 poços. Controles negativos utilizando-se todos os reagentes exceto cDNA foram feitos em

paralelo, bem como reações usando amostras RT-. Os ciclos de amplificação foram constituídos de 95 °C por 3 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos e 55 °C por 30 segundos. Curvas de dissociação foram obtidas ao final pelo aquecimento dos produtos de PCR de 65 a 95 °C, a fim de se verificar a especificidade das reações.

A expressão relativa do gene entre os diferentes mutantes de *L. biflexa* foi analisada pelo método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ e o gene do locus *rfb* foi usado como controle interno para normalização da expressão gênica.

3.36 Avaliação da redução da atividade da trombina causado pelo mutante de *L. biflexa* expressando a proteína Lsa23

Células de *L. biflexa* sorovar Patoc transformadas com o plasmídeo pMaOri selvagem ou contendo as diferentes construções do gene LIC11360 (Lsa23) foram coletadas do meio de cultura por centrifugação (4.000 x g, 15 min), lavadas três vezes e então resuspendidas em uma solução de PBS contendo 0,1% BSA e 1,25 U/mL de trombina humana, a uma concentração final de 5×10^9 leptospiros/mL. Após duas horas de interação, 10 µL das soluções foram dispostos em placas de ELISA juntamente com 90 µL de uma solução de fibrinogênio humano (1 mg/mL), sendo a formação do coágulo de fibrina monitorada por 1 hora. O experimento foi feito em triplicata e um controle ao qual não foi colocado fibrinogênio foi incluído nos nossos experimentos, para se descontar uma possível sedimentação bacteriana. As leituras das placas foram feitas no comprimento de onda de 595 nm a cada 2 minutos para se medir a formação do coágulo de fibrina.

3.37 Análises estatísticas

Todos os resultados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Para comparações múltiplas, foi empregado o teste ANOVA com pós-teste t. As comparações de médias pareadas foram feitas pelo teste t-Student. Um p-valor abaixo de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Todos os experimentos foram realizados com repetição. Para os *western blottings* são mostradas figuras representativas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Leptospira* spp. se ligam fracamente à protrombina e não impedem sua ativação mediada por Fator Xa

A protrombina é uma glicoproteína dependente de vitamina K, encontrada no plasma em uma concentração de aproximadamente 100 µg/mL e sintetizada no fígado. Antes de ser secretada no plasma, a molécula sofre modificações pós-translacionais em seus resíduos de ácido glutâmico, reação esta catalisada por uma enzima carboxilase dependente de vitamina K (HUANG et al., 2003; KRISHNASWAMY, 2013). A protrombina é o zimógeno circulante no plasma, sendo ativada à trombina a partir de uma reação de proteólise mediada por Fator Xa ou complexo protrombinase, formado pela associação entre FXa e FVa. A redução nos níveis circulantes de protrombina acarreta em uma menor formação de trombina, e consequentemente menor formação de coágulo de fibrina.

A proteína não-estrutural do vírus da dengue, NS1, foi descrita como ligante de protrombina humana, dificultando sua ativação mediada por fator Xa, provavelmente contribuindo ao elevado tempo de tromboplastina parcial em pacientes com dengue hemorrágica (LIN et al., 2012).

Chierakul et al. (2008) reportaram que pacientes com leptospirose apresentavam tempos de protrombina aumentados, o que pode ser devido à redução ou inativação de alguns fatores de coagulação no plasma, como por exemplo, fator II (protrombina), fator X ou fator V. Ademais, foi demonstrado que porquinhos da índia infectados experimentalmente com *L. interrogans* sorovar Copenhageni apresentaram tempos de protrombina elevados nos primeiros dias de infecção (DA SILVA et al., 1995).

Como a leptospirose severa apresenta quadros hemorrágicos bastante intensos, foi verificado se diferentes cepas de leptospiros seriam capazes de interagir com a protrombina e, por conseguinte, reduzir sua ativação à trombina. Diferentes concentrações de leptospiros foram incubadas com protrombina por 2 horas e o sobrenadante das interações após centrifugação foi utilizados para imobilização em placas de ELISA. As concentrações ótimas para incubação foram previamente definidas por meio de uma curva de titulação, feita com diferentes massas de componente imobilizado. A concentração escolhida para trabalho foi aquela que se enquadrava em uma faixa de diminuição de DO em resposta à diminuição da massa de componente imobilizada.

Foi observada uma ligeira redução no sinal nas maiores concentrações de leptospira empregadas (Figura 10A), o que denota em uma possível ligação do componente à superfície das bactérias. Os valores de absorbância foram utilizados para inferir a massa de componente capturado pelas bactérias (Figura 10B). Nas maiores concentrações celulares utilizadas (5×10^8 células/mL), não foi observada diferença significativa entre a ligação da protrombina às distintas cepas. Cabe ressaltar que essas concentrações do componente trabalhadas foram as máximas conseguidas, por limitação da técnica, ou seja, as DOs geradas por massas maiores imobilizadas não apresentavam diferença, quer por saturação dos sítios afins de proteína nos poços da placa de ELISA ou por saturação da ligação dos anticorpos.

Figura 10- Avaliação da ligação de diferentes cepas de *Leptospira* à protrombina humana

(A) As cepas *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130, virulenta, *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, patogênica e atenuada em cultura e a cepa saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1 foram incubadas com protrombina (2 µg/mL), centrifugadas e o sobrenadante empregado para imobilização em placas de ELISA. Após lavagem das placas e bloqueio de sítios inespecíficos, a detecção dos componentes foi feita por meio de anticorpos anti-protrombina (1:1.000), seguido de incubação com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:4.000). Uma curva padrão foi empregada para se definir a massa de componente ligada às bactérias (B). A comparação das diferenças encontradas na maior concentração da bactéria foi feita por meio do teste estatístico ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

A imobilização do componente à placa de ELISA pode ter sido enviesada por leptospiros que porventura não tenham sido sedimentadas na centrifugação ou por proteínas secretadas durante a interação entre a bactéria e o componente. Para corroborar os resultados apresentados, foi feito um *western blotting* para detecção da protrombina em diferentes situações: sobrenadante, *pellet* após a interação e o *pellet* lavado uma vez com solução salina, para detecção da protrombina mantida ligada.

A concentração empregada de protrombina para as incubações foi de 40 µg/mL, o que está bem próximo da concentração fisiológica do componente, sendo a concentração celular de leptospiros utilizada 5×10^9 /mL, acima do que normalmente se encontra durante a fase de leptospiremia na infecção. Estudos utilizando PCR quantitativo relataram níveis acima de 10^6

bactérias/mL de sangue, podendo este número pode ser maior ainda para leptospiros com menor virulência (AGAMPODI et al., 2012).

Conforme apresentado na Figura 11, após a interação com a protrombina, apenas uma interação bastante modesta e reversível foi observada nas cepas patogênicas, tanto virulenta (L1-130) quanto atenuada (M20), uma vez que após lavagem, toda reatividade foi perdida (P*). A cepa saprofítica mostrou maior interação com o componente, porém esta interação é presumivelmente de baixa afinidade, uma vez que a reatividade é perdida após lavagem do *pellet* com solução salina (Figura 11). Esses resultados sugerem que as leptospiros interagem fraca e transientemente com a molécula de protrombina.

Figura 11- Avaliação da ligação de diferentes cepas de *Leptospira* à protrombina por *western blotting*

As cepas virulenta *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130, patogênica atenuada em cultura *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 e saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1 foram incubadas com 40 µg/mL de protrombina humana e então amostras de três tratamentos distintos foram aplicadas em gel e transferidas para membrana de nitrocelulose: sobrenadante (SN), *pellet* (P) e *pellet* lavado com solução salina (P*); “B” refere-se ao extrato de bactéria isento do componente. A detecção da protrombina foi feita com anti-protrombina (1:2.000) seguido de incubação com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:4.000) e substrato luminescente.

Mesmo a cepa virulenta FIOCRUZ L1-130 não apresentando uma ligação expressiva à protrombina, foi investigado se essas bactérias seriam capazes de interferir na ativação do componente à trombina, em uma reação mediada por Fator Xa. Após a incubação da protrombina com diferentes concentrações celulares da cepa virulenta em um tampão contendo cálcio, o Fator Xa foi adicionado e a reação continuada por 5 horas adicionais, sendo este tempo previamente definido em uma cinética de reação. Foram empregados anticorpos anti-protrombina (Figura 12A) e anti-trombina (Figura 12B) para detecção da protrombina e dos produtos de ativação por *western blotting*.

Esses experimentos mostraram que a protrombina foi totalmente consumida na reação ao final de 5 horas (PT na Figura 12A e B), ao mesmo tempo em que fragmentos de massa molecular próxima a 30 kDa foram detectados, sendo o fragmento de ativação F1+2 detectado

após incubação com anticorpos anti-protrombina (F1+2) e a própria trombina detectada com anticorpos anti-trombina (T). Na maior concentração testada de leptospiiras, nenhum fragmento de ativação (F1+2) ou trombina foram detectados, sugerindo que a cepa virulenta FIOCRUZ L1-130 participa diretamente na degradação desses produtos de ativação ou indiretamente na degradação da protrombina, reduzindo consequentemente a formação de seus produtos. A despeito desta possível degradação, as leptospiiras virulentas são incapazes de bloquear a ativação de protrombina em trombina, sendo que outros mecanismos devem ser responsáveis pelo maior tempo de protrombina durante a leptospirose.

Figura 12- Leptospiiras virulentas são incapazes de bloquear a ativação de protrombina em trombina

A cepa virulenta *L. interrogans* sorovar Copenhageni FIOCRUZ L1-130 foi incubada com uma solução de protrombina (40 µg/mL) por 1 hora e então acrescida de uma solução contendo Fator Xa. Após 5 horas de incubação, as frações proteicas foram avaliadas por *western blotting* utilizando anticorpos anti-protrombina (1:2.000) (A), que reconhecem a molécula inteira (72 kDa) e o fragmento de ativação F1+2, ou com anticorpos anti-trombina (1:3.000) (B), que reconhecem a molécula de protrombina e a trombina resultante de sua ativação. A reatividade foi detectada após incubação com anticorpos anti-IgG de coelho conjugados com peroxidase e substrato quimioluminescente.

4.2 Leptospiiras virulentas se ligam eficientemente à trombina

Trombina, uma enzima chave da cascata de coagulação, é gerada a partir de sua forma inativa (protrombina) por meio da clivagem mediada pelo fator Xa, atuando na clivagem e ativação de diversos zimógenos que participam na formação e estabilização do coágulo de fibrina (SILLER-MATULA et al., 2011; WOLBERG; CAMPBELL, 2008). Ademais, a enzima converte o fibrinogênio solúvel em uma rede tridimensional de fibrina insolúvel

(DOOLITTLE, 1984; WEISEL, 2005). Uma vez que a trombina age sobre diversos substratos e desempenha um *feedback* positivo na sua própria síntese (WOLBERG; CAMPBELL, 2008), a modulação da atividade desta enzima por patógenos poderia refletir em mudanças drásticas na formação do coágulo.

Para se avaliar a interação das bactérias com a trombina humana, diferentes cepas de leptospira foram incubadas com 10 U/mL (cerca de 5 µg/ml) da enzima por 2 horas a 37 °C, sendo o sobrenadante resultante da interação utilizado para imobilização em placas de ELISA. Conforme mostrado na Figura 13A, com o aumento das densidades celulares empregadas, menor foi o sinal do componente detectado no sobrenadante após centrifugação, denotando em uma maior massa de trombina ligado à superfície das bactérias.

Os valores de DO gerados (Figura 13A) foram utilizados para calcular a massa de trombina ligada às leptospiros, por meio de regressão linear a partir de uma curva padrão (Figura 13B). A cepa virulenta foi capaz de se ligar mais eficientemente à trombina, capturando quase metade do componente disponível na reação (0,45 µg de 1 µg), seguida pela cepa patogênica atenuada ($p < 0,01$) e pela cepa saprofítica *L. biflexa* ($p < 0,01$).

Figura 13- Avaliação da ligação de diferentes cepas de *Leptospira* à trombina humana

(A) As cepas *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130, virulenta, *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, patogênica e atenuada em cultura e a cepa saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1 foram incubadas com trombina humana (10 U/mL), centrifugadas e o sobrenadante empregado para imobilização em placas de ELISA. Após lavagem das placas e bloqueio de sítios inespecíficos, a detecção do componente foi feita por meio de anticorpos anti-trombina (1:3.000), seguido de incubação com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:4.000). Uma curva padrão foi empregada para se definir a massa de componente ligada às bactérias (B). A comparação das diferenças encontradas na maior concentração da bactéria foi feita por meio do teste estatístico ANOVA seguido de pós-teste de Tukey (** $P < 0.01$).

Para se confirmar os resultados obtidos, foi feito um *western blotting* após interação com 20 U/mL de trombina para detecção da mesma em diferentes situações: sobrenadante e *pellet* após a interação, e o *pellet* após interação lavado uma vez, para detecção da trombina mantida ligada.

Leptospiras virulentas FIOCRUZ L1-130 foram capazes de se ligar mais eficientemente à trombina em relação às outras cepas, o que é demonstrado pela alta e baixa reatividade detectada no *pellet* bacteriano (P) e sobrenadante (SN), respectivamente (Figura 14), o que está de acordo com os resultados prévios. Também, a ligação parece ser forte no caso desta cepa, pois a maioria da trombina ligada, cerca de 80%, permaneceu nas células bacterianas após uma lavagem com solução salina (P*).

Figura 14- Western blotting da interação entre as leptospiros e trombina humana

(A) As cepas virulenta *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130, patogênica atenuada em cultura *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 e saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1 foram incubadas com 20 U/mL de trombina humana e então amostras de três tratamentos distintos foram aplicadas em gel e transferidas para membrana de nitrocelulose: sobrenadante (SN), *pellet* (P) e *pellet* lavado com solução salina (P*). Foi incluído um controle no qual as leptospiros não foram incubadas com o componente, “B”. A detecção da trombina foi feita com anti-trombina (1:4.000) seguido de incubação com anti-IgG de coelho (1:4.000) e substrato luminescente. “T” refere-se ao controle positivo no qual a trombina é visualizada. (B) Determinação da intensidade das bandas de detecção, definidos por meio de densitometria e com valores expressos em unidades arbitrárias.

A cepa patogênica atenuada em cultura M20 também foi capaz de se ligar à trombina, porém em menor magnitude que a cepa virulenta, o que é denotado pela maior reatividade no sobrenadante após interação, e presumivelmente esta interação é mais fraca, já que menos enzima foi retida no *pellet* bacteriano após lavagem com solução salina, sendo que quase metade do componente ligado foi perdida (Figura 14A e B). Apenas uma baixa interação foi

observada com a cepa saprofítica, sugerindo que a interação das leptospiros com trombina representar um novo mecanismo de virulência.

A interação entre as cepas de leptospira e a trombina também foi ensaiada por citometria de fluxo. Em suma, as cepas foram incubadas com a trombina humana, as células lavadas e então o componente ligado à superfície foi detectado com anticorpos anti-trombina e anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo FITC. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Bioscience), sendo os valores de mediana de fluorescência comparados (Figura 15).

Pela análise das fluorescências obtidas, pode-se concluir que a cepa virulenta apresenta uma ligação muito mais expressiva à enzima, seguida pela cepa patogênica atenuada em cultura e pela saprofítica, corroborando, portanto, os resultados obtidos.

Figura 15- Avaliação da ligação das leptospiros à trombina por citometria de fluxo

L. interrogans sorovar Copenhageni cepas FIOCRUZ L1-130 (A), M20 (B) e *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1 (C) foram incubadas com 200 µL de PBS 0,1% BSA contendo 20 U/mL de trombina (10 µg/mL) por 2 horas a 37° C. Após três lavagens com PBS, as células foram incubadas com anticorpos anti-trombina humana feitos em camundongo (1:200), seguido por incubação com anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados com FITC (Isotiocianato de fluoresceína), na diluição de 1:500. Um controle no qual as leptospiros não foram incubadas com trombina foi empregado para se descontar a reatividade cruzada do sistema. Após fixação das amostras com 1% paraformaldeído por 1 hora, estas foram analisadas por citometria de fluxo.

A interação entre a trombina e a cepa virulenta foi mais bem caracterizada: primeiramente, esta cepa foi incubada com concentrações crescentes de trombina humana por 2 horas, centrifugada e o *pellet* bacteriano avaliado por *western blotting* com anticorpos anti-trombina. A interação observada foi dose-dependente, sendo obtidas maiores reatividades após incubação com 10 U/mL da enzima (aproximadamente 0,14 µM) (Figura 16A), porém, na faixa de concentração utilizada não foi obtida a saturação da ligação, indicando que

maiores concentrações de trombina possam ser capturadas pelos receptores de superfície das leptospiiras.

Figura 16- Caracterização da ligação de leptospiiras virulentas à trombina humana

(A) A cepa virulenta *L. interrogans* sorovar Copenhageni FIOCRUZ L1-130 (5×10^9 células/mL) foi incubada com diferentes concentrações de trombina humana (0-40 U/mL) por 2 horas a 37 °C, centrifugada e o *pellet* resultante ressuspensionado e aplicado em gel de poliácridamida. As proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulosa foram incubadas com anti-trombina (1:4.000) por 1 hora e com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:4.000) por mais uma hora seguido de adição de substrato quimioluminescente. Em (B), os *pellets* após interação foram lavados até três vezes com solução salina antes de serem ressuspensionados e aplicados em gel, sendo a trombina mantida ligada verificada por *western blotting*. A linha “B” refere-se ao branco da reação, isento de trombina. (C) As leptospiiras também foram incubadas com trombina por diferentes tempos (0,5-2 horas) antes da centrifugação. As análises densitométricas das bandas obtidas estão presentes em (D-F).

A lavagem do *pellet* bacteriano com solução salina após incubação com 20 U/mL resultou na manutenção de grande parte da enzima ligada, mesmo após 3 lavagens sequenciais, após as quais cerca de 50% do componente permaneceu ligado (Figura 16B e E). Este resultado indica que a ligação entre a trombina e a cepa virulenta utilizada é bastante específica, atingindo seu máximo de ligação após 1 hora de interação com 20 U/mL da enzima e 5×10^9 células/mL (Figura 16C e F).

Apesar da praticamente inexistente interação das bactérias à protrombina, leptospiiras virulentas apresentaram uma ligação forte e dose dependente à trombina. Isto pode ser

explicado pelo fato da enzima possuir regiões que são funcionalmente inacessíveis e crípticas na molécula de protrombina e que se tornam expostas após sua ativação: o sítio ativo e as regiões carregadas de ligação aos substratos, cunhadas de exosítios, cruciais no amplo espectro de ligantes e especificidade de ação da enzima (BODE; TURK; KARSHIKOV, 1992; WU et al., 1994). Assim sendo, foi avaliado se a interação das leptospiros virulentas com a trombina se dá por intermédio de algumas destas regiões, por meio da utilização de três competidores/inibidores: hirudina, um inibidor direto bivalente capaz de se ligar concomitantemente ao exosítio I e sítio catalítico; hirugênio, uma porção da hirudina que se liga e bloqueia apenas o exosítio I, e argatroban, uma molécula sintética capaz de interagir com o sítio catalítico da enzima, bloqueando sua atividade (DI NISIO; MIDDELDORP; BÜLLER, 2005).

Leptospiras virulentas FIOCRUZ L1-130 foram coincubadas com 20 U/mL de trombina, na presença ou ausência de cada inibidor. Após a interação, sobrenadante e *pellet* foram submetidos à SDS-PAGE e então *western blotting* para detecção das bandas de trombina. Os resultados mostram que após incubação com hirugênio, praticamente toda trombina da reação foi encontrada no sobrenadante, o que indica que a interação entre esta e as leptospiros foi impedida pelo competidor de exosítio I (Figura 17A). A presença do inibidor bivalente hirudina na reação causou praticamente um total bloqueio da interação, uma inibição ligeiramente maior que a causada pelo hirugênio, sugerindo também uma pequena participação do sítio catalítico na ligação.

Quando argatroban foi adicionado à reação, pouco ou nenhum efeito foi observado na interação das bactérias ao componente, indicando o papel coadjuvante do sítio catalítico na ligação à trombina (Figura 17A). A análise densitométrica das bandas obtidas no *pellet* bacteriano mostra que o exosítio I desempenha um papel essencial na ligação à enzima em estudo, contribuindo com cerca de 80% da interação (Figura 17B).

O bloqueio do exosítio I pela ligação da trombina às leptospiros pode impactar fortemente o reconhecimento de diversos substratos, entre eles o fibrinogênio, Fator V (cuja forma ativada, FVa participa do *feedback* positivo de geração de trombina), Fator XIII (FXIIIa atua na estabilização do coágulo por *crosslink*) e Fator VIII (FVIIIa faz parte do complexo tenase intrínseco), os quais são reconhecidos por este sítio de ligação.

Figura 17- Determinação dos sítios de interação na molécula de trombina

(A) A cepa virulenta *L. interrogans* sorovar Copenhageni FIOCRUZ L1-130 foi incubada com 20 U/mL de trombina juntamente com os inibidores hirugênio, hirudínia e argatroban, para que houvesse competição. Após 2 horas de interação, as soluções foram centrifugadas e sobrenadante (SN) e *pellet* (P) aplicados em SDS-PAGE e as proteínas separadas transferidas para membrana de nitrocelulose. A detecção da trombina foi feita com o uso de anticorpos anti-trombina (1:4.000) seguido de incubação com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:4.000) e reagente quimioluminescente. (B) A intensidade das bandas resultantes da reação referentes à trombina ligada às bactérias, ou seja, *pellet*, foram quantificadas por densitometria.

4.3 Soros de pacientes com leptospirose não apresentam níveis detectáveis de complexos proteína-trombina

Embora nossos experimentos demonstrem que a trombina interaja diretamente com a superfície das leptospiros, foi investigada a possível secreção de ligantes no soro de pacientes diagnosticados com leptospirose, por meio da detecção de complexos moleculares compostos por proteínas de leptospira/trombina. Já foi observado que soros de indivíduos acometidos por dengue apresentam altos níveis de complexo NS1-trombina, detectáveis por ELISA de captura utilizando anticorpos anti-trombina imobilizados (LIN et al., 2012). Outrossim, a sensibilidade do teste de detecção dos complexos em soro de pacientes foi expressivamente maior do que a o teste tradicional e comercial de detecção do antígeno NS1, sendo proposto um novo método de diagnóstico.

Anticorpo anti-trombina foi imobilizado em placa de ELISA, a qual foi incubada com soro de pacientes na fase inicial da leptospirose (MAT-), convalescente (MAT+) ou soro de indivíduos saudáveis (normal). Então, a detecção de possíveis antígenos de leptospira ligados à trombina (capturada pelo anticorpo imobilizado) foi feita por meio da incubação com soro de hamsters imunizados com bacterina, seguido de incubação com anti-IgG de hamster conjugado com peroxidase.

A reatividade obtida pela incubação de soro de pacientes com leptospirose não foi estatisticamente diferente daquela obtida pelos soros normais (Figura 18), sugerindo que não

exista a formação de tais complexos durante a infecção ou que, caso eles ocorram, sejam instáveis, uma vez que os soros disponíveis em nosso laboratório estão armazenados há um longo período.

Figura 18- Soro de pacientes com leptospirose não apresenta complexos trombina-proteína

Anticorpos anti-trombina (1:500) foram imobilizada em uma placa de ELISA (100 μ L/poço) e após 16 horas, as placas foram lavadas e bloqueadas com PBS-T contendo 1% BSA. Então, um *pool* de soro de indivíduos na fase inicial (MAT-), convalescente (MAT+) e saudáveis (normal) foi adicionado (1:100). Após 2 horas de incubação, as placas foram lavadas e a detecção de proteínas de leptospira foi feita pela incubação com antissoro anti-bacterina desenvolvido em hamster (1:2000), seguido de incubação com anti-IgG de hamster conjugado com peroxidase (1:5.000), por 1 hora a 37 °C. A reatividade foi detectada com substrato OPD.

4.4 Leptospiras são capazes de bloquear a atividade da trombina humana e reduzir a formação do coágulo de fibrina

A formação do coágulo de fibrina tem sido mostrada como um processo chave na contenção de patógenos e inibição da disseminação dos mesmos; alguns patógenos, como por exemplo, *Treponema pallidum*, são capazes de interagir com componentes do hospedeiro para reduzir a formação do coágulo de fibrina, favorecendo, portanto a rápida disseminação deste micro-organismo (RIVERA et al., 2007).

Para se confirmar que a ligação das leptospiras à trombina dificulta o reconhecimento desta aos seus substratos naturais e para se verificar uma possível relevância biológica desta interação na formação do coágulo de fibrina, diferentes cepas de leptospira foram incubadas com a enzima por 2 horas, previamente à adição de uma solução de fibrinogênio humano.

A concentração ótima de trombina para os experimentos foi estabelecida por meio de uma curva padrão contendo diferentes concentrações da enzima, conforme mostrado na Figura 19. Foi selecionada a concentração de 1,25 U/mL (cerca de 10 nM) em tampão

contendo 0,1 % BSA para incubação com as diferentes cepas de bactéria. Pode-se notar que em maiores concentrações, a saturação do coágulo é rapidamente atingida, compondo-se de menores densidades óticas. É bem sabido que a trombina, em menores concentrações, produz coágulos de fibrina altamente permeáveis, compostos por fibras mais grossas e de entrelaçamento mais frouxo, mais suscetíveis à fibrinólise (COLLET et al., 2000).

Figura 19- Cinética enzimática da clivagem da formação do coágulo de fibrina catalisada pela trombina

Diferentes concentrações de trombina humana foram diluídas em PBS contendo 0,1% BSA e então 10 μ L destas soluções foram colocadas em contato com 90 μ L de uma solução de fibrinogênio humano (1 mg/mL). A formação do coágulo foi acompanhada pelo aumento da turbidez da solução, monitorada por aproximadamente 1 hora.

As leptospiros foram incubadas com trombina humana (1,25 U/mL) por 2 horas a 37 °C, sendo então adicionada a solução de fibrinogênio. Este experimento foi repetido 4 vezes e a Figura 20 traz um resultado representativo dos experimentos de cinética de formação de trombina. Ao final do monitoramento da cinética, a absorbância do coágulo produzido após incubação com a cepa virulenta FIOCRUZ L1-130 se mostrou abaixo da absorbância referente à concentração de 0,31 U/mL (25% de atividade); leptospiros patogênicas e avirulentas conseguiram inibir parcialmente a atividade da trombina, uma vez que a cinética foi bastante coincidente com a curva gerada pela concentração de 0,62 U/mL (50% de atividade). Em contrapartida, a cepa saprofítica promoveu inibição pouco expressiva na atividade da trombina, sendo a curva de geração do coágulo coincidente com a curva gerada pela máxima concentração de trombina (1,25 U/mL).

A Figura 20B mostra a inibição total promovida pelas diferentes cepas de leptospira, cujos valores foram definidos por meio de equação gerada pelas absorbâncias referentes a cada concentração de trombina ao final do experimento.

Figura 20- Inibição da atividade da trombina na formação do coágulo de fibrina por diferentes cepas de *Leptospira* spp.

(A) Trombina (1,25 U/mL) foi incubada com as cepas virulenta *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130, patogênica atenuada em cultura *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 e saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1 (5×10^9 células/mL) por 2 horas a 37° C. Após, as soluções (10 µL) foram colocadas em contato com uma solução de fibrinogênio (90 µL de uma solução 1 mg/mL). A formação do coágulo foi monitorada pelo aumento da turbidez do meio, monitorada pelo comprimento de onda de 595 nm. Um controle no qual não foi adicionado trombina também foi empregado (0 U/mL). Em (B), os valores de DO referentes ao coágulo no final da cinética foram utilizados para se inferir a redução da atividade da trombina, por regressão em comparação aos valores da curva padrão. A comparação das diferenças encontradas foi feita por meio do teste estatístico ANOVA seguido de pós-teste de Tukey (**P<0.01).

Foi demonstrado que a proteína YopM de *Yersinia pestis* é capaz de evitar a agregação plaquetária induzida por trombina, sendo uma proteína crucial para os estágios iniciais da infecção em modelo animal, e portanto necessária para a virulência do patógeno em

camundongos (LEUNG; REISNER; STRALEY, 1990). Em seguida, trabalhos de Reisner e Straley (1992) mostraram que a proteína YopM se liga a molécula de trombina (e não a molécula de protrombina), sendo esta interação confirmada e caracterizada por Hines et al. (2001).

A proteína do vírus da dengue NS1, embora tenha mostrado ligação à trombina, não foi capaz de inibir sua atividade (LIN et al., 2012); existem duas possibilidades para este resultado: a primeira é que a região de ligação se localiza em regiões biologicamente irrelevantes na molécula de trombina, o que não é explorado no trabalho, e a segunda é que o experimento produzido pelos autores é falho, uma vez que a atividade da trombina foi avaliada com uso de um substrato sintético cromogênico, e não fibrinogênio, ou seja, pode ser que a ligação de NS1 à trombina bloqueie o exossítio I, o que acarretaria no bloqueio da atividade da enzima frente seus substratos naturais, já que os substratos cromogênicos por serem pequenos, não são afetados por tal bloqueio.

A redução da atividade da trombina pelas leptospiros virulentas não só afetaria a formação do coágulo, mas também suas propriedades viscoelásticas, aumentando sua suscetibilidade à ação de efeitos fibrinolíticos, uma vez que menores concentrações de trombina produzem coágulos mais frágeis. Vieira et al. (2009) demonstraram que leptospiros são capazes de capturar plasminogênio do plasma humano e subverter a maquinaria do hospedeiro para convertê-lo em plasmina, a principal enzima fibrinolítica, que seria mais eficiente em degradar estes coágulos formados por menores concentrações de trombina.

Nosso grupo também mostrou que as leptospiros são capazes de interagir com fibrinogênio, bloqueando parcialmente este componente à clivagem pela trombina (OLIVEIRA et al., 2013). Apesar desta interação, nossos resultados mostram que as leptospiros virulentas são capazes de interagir com a trombina e dificultar seu acesso ao fibrinogênio, promovendo, então, uma obstrução bilateral. Níveis normais de fibrinogênio no plasma humano variam de 6 a 12 μM (WEISEL, 2005) e durante a coagulação as concentrações de trombina livre podem variar de menos de 1 nM, durante a reação de iniciação, para mais de 500 nM, durante a fase de amplificação (WOLBERG; CAMPBELL, 2008).

Assim, em virtude das baixas concentrações nas fases iniciais da coagulação, a trombina poderia constituir um alvo mais efetivo e conveniente ao bloqueio mediado pelas leptospiros, atuando em conjunto com os outros mecanismos descritos e consequentemente favorecendo a disseminação do patógeno após dano endotelial, que poderia ser acarretado

possivelmente por interação das leptospiplas com e-caderina (EVANGELISTA et al., 2014a), integrinas (ZHANG et al., 2012) (gerando um remodelamento das células endoteliais), secreção de colagenase (KASSEGGNE et al., 2014), degradação de componentes via plasmina (VIEIRA et al., 2009) ou ainda pelos efeitos deletérios da inflamação e aumento de metaloproteases de matriz durante a leptospirose (VIEIRA et al., 2013).

4.5 Leptospiras virulentas promovem uma degradação de trombina dependente de cálcio

Uma vez que não foram observados os produtos de ativação da protrombina após incubação com a cepa virulenta de leptospira em tampão contendo cálcio (Figura 12), foram feitos experimentos adicionais para se definir se a bactéria estaria agindo diretamente sobre a protrombina ou sobre seus produtos após ativação mediada por FXa. Para tal, as leptospiplas foram incubadas por 5 horas com protrombina ou trombina em tampão Tris-NaCl contendo 10 mM de CaCl_2 . Conforme mostrado na Figura 21, após incubação e separação das misturas por centrifugação, toda a protrombina foi verificada no sobrenadante, corroborando a baixa ligação deste componente às bactérias, e nenhuma degradação foi observada, uma vez que as reatividades detectadas na presença e ausência das bactérias foram equivalentes. Curiosamente, a reatividade do fragmento de ativação (FA, ou F1+2) após contato com as leptospiplas foi expressivamente menor, denotando um processo de degradação.

Após incubação da cepa virulenta com trombina, nenhuma reatividade foi detectada, tanto no sobrenadante quanto no *pellet*, sugerindo uma possível degradação, presumivelmente influenciada pela presença de íons cálcio (Figura 21B). Para confirmar esses resultados, foram empregados 3 diferentes tampões na incubação das bactérias com a trombina, a saber, PBS, Tris-NaCl e Tris-NaCl acrescido de 10 mM CaCl_2 . A adição de cálcio no tampão PBS gerou a precipitação de fosfato de cálcio, impedindo a análise nestas condições. Em tampões livre de cálcio, a maioria da trombina foi verificada associada ao *pellet* bacteriano, como já demonstrado anteriormente; a presença de cálcio promoveu a degradação do componente ligada às bactérias após 2 horas de incubação (Figura 21C). Assim, foi testada a influência de diferentes concentrações do íon, variando desde uma situação fisiológica (aproximadamente de 2 mM) até um excesso do mesmo.

Conforme mostrado na Figura 21D, na menor concentração iônica empregada, apenas uma ligeira degradação da trombina foi observada, em contraste com uma quase total

degradação detectada na maior concentração utilizada, o que está de acordo com o observado nos experimentos acima.

Figura 21- *Leptospiras* virulentas apresentam uma atividade proteolítica cálcio-dependente sobre a trombina

Protrombina (40 µg/mL) (A) e trombina (20 U/mL) (B) foram incubadas com 5×10^9 células de leptospiros virulentas em tampão Tris-NaCl (50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8.3) contendo 10 mM CaCl_2 . Após 5 horas de incubação, as soluções foram centrifugadas ($4.000 \times g$ por 15 minutos) e ambos sobrenadante (SN) e *pellet* (P) coletados. As proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose foram incubadas com anti-protrombina (1:2000) ou anti-trombina (1:4000). PT, FA (também chamado de F1+2) e T nas setas indicam protrombina, fragmento de ativação e trombina, respectivamente. Um controle sem leptospiros (SL) também foi empregado. Em (C), a degradação da trombina foi avaliada em diferentes tampões: PBS (1), Tris-NaCl (2) e Tris-NaCl contendo 10 mM CaCl_2 (3). Sobrenadante e *pellet* foram avaliados. (D) A influência da concentração de cálcio sobre a degradação da trombina promovida pelas leptospiros (5×10^9) foi feita com incubação com concentrações crescentes do íon (0-10 mM). (E) O experimento de degradação da trombina foi feito com a cepa virulenta em contraponto à cepa saprofítica, na presença de 10 mM de cálcio. A reação coincubada (C), sobrenadante (SN) e *pellet* (P) foram submetidos à SDS-PAGE, seguido de *western blotting* com anticorpos anti-trombina (1:4.000).

Foi avaliado se este efeito proteolítico é uma característica exclusiva de cepas virulentas, o que denotaria um possível papel biológico na patogênese da bactéria. Conforme apresentado na Figura 21E, a degradação da trombina foi restrita à cepa virulenta L1-130,

uma vez que a bactéria saprofítica não promoveu qualquer degradação do componente em tampão contendo cálcio. Ademais, grande parte da trombina em contato com esta cepa foi observada no sobrenadante, corroborando a baixa afinidade de ligação apresentada por *L. biflexa*. Estes resultados sugerem que a degradação da trombina pode vir a constituir um novo evento associado à virulência apresentado pelas leptospiros, uma vez que a redução da concentração da trombina disponível poderia acarretar em uma menor formação do coágulo de fibrina.

Embora tenha sido mostrada uma degradação do fragmento de ativação, a implicação biológica deste achado permanece incógnita. Já foi demonstrado que este fragmento atua como um mensageiro para a síntese de proteínas dependentes de vitamina K pelo fígado (MITROPOULOS; ESNOUF, 1990), como protrombina e fator X. A degradação desse fragmento teria implicações na síntese desses componentes, reduzindo seus níveis circulantes. Porém, foram verificados níveis aumentados desse fragmento de ativação em soro de pacientes com leptospirose (CHIERAKUL et al., 2008; WAGENAAR et al., 2010). Uma vez que as leptospiros virulentas são incapazes de interagir eficientemente com a protrombina e promover sua degradação, provavelmente outros mecanismos moleculares estão subjacentes ao elevado tempo de protrombina durante a leptospirose.

Foi ensaiado se a degradação da molécula de trombina na presença de íons cálcio, apresentada pela cepa virulenta L1-130, acarretaria em uma inibição ainda maior da atividade da enzima frente a seu substrato natural, o fibrinogênio. Experimentos prévios mostraram que a cepa virulenta em questão exerce em torno de 80% de inibição sobre a atividade da enzima (Figura 20), quando utilizado tampão destituído de cálcio nas incubações. Quando esta cepa foi incubada com a trombina na presença de diferentes concentrações de cálcio, pode-se observar um aumento de seu potencial inibitório, passando a apresentar cerca de 90% de inibição sobre a enzima, a qual, consistentemente, não foi inibida pela cepa saprofítica, tanto na presença quanto na ausência de íons cálcio.

O potencial proteolítico das leptospiros virulentas sobre a molécula de trombina e consequentemente o aumento do efeito inibitório sobre a atividade da mesma são mais pronunciados em concentrações de cálcio acima do fisiológico.

Interessantemente, as concentrações deste íon são mais elevadas nos locais de injúria, nos quais deve acontecer a formação do coágulo de fibrina, uma vez que após lesão endotelial as plaquetas se aderem ao colágeno presente em tecidos subendoteliais e são ativadas, resultando na emissão de pseudópodes e liberação de grânulos, dentre os quais se encontram

os grânulos δ , ricos em ATP, ADP e cálcio (PALTA; SAROA; PALTA, 2014), aumentando, portanto, a concentração local deste íon no local do dano vascular, o que poderia favorecer o mecanismo proteolítico das leptospiros sobre a molécula de trombina.

Figura 22- Íons cálcio favorecem o efeito inibitório das leptospiros sobre a atividade da enzima trombina

L. interrogans sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130, virulenta, e a saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1 (5×10^9 células/mL) foram incubadas com 1,25 U/mL de trombina humana em solução 150 mM NaCl contendo diferentes concentrações de cloreto de cálcio (0-10 mM). Após duas horas, 10 μ L das soluções foram dispostas em placas de ELISA juntamente com 90 μ L de solução de fibrinogênio humano (1 mg/mL) para avaliação da formação do coágulo de fibrina, monitorada pelo aumento da turbidez da solução, monitorada pelo comprimento de onda de 595 nm. Os valores de DO referentes ao coágulo no final da cinética foram utilizados para se inferir a redução da atividade da trombina, por regressão em comparação aos valores da curva padrão. A significância estatística do aumento do efeito inibitório pela presença dos íons cálcios foi observada por meio do teste t-Tukey, em relação ao tratamento desprovido de cálcio (* $P < 0,05$).

Proteínas da família HtrA (do inglês, *High Temperature Requirement A*), encontradas em diversos tipos celulares, desde procariotos até primatas (CLAUSEN et al., 2011; PALLÉN; WREN, 1997), são um grupo de serino proteases caracterizado pela presença de um domínio proteolítico e um ou mais domínios PDZ, responsáveis pela interação proteína-proteína; foi demonstrado que proteínas do tipo HtrA em *Synechocystis* spp. apresentam atividade proteolítica aumentada em resposta à presença de íon bivalentes, como cálcio e magnésio, atingindo seu máximo de atividade em 10 mM de CaCl_2 (HUESGEN et al., 2011). Adicionalmente, a proteína HtrA de *Borrelia burgdorferi* é capaz de degradar *in vitro* componentes da matriz extracelular na presença de cálcio, favorecendo a disseminação do patógeno (RUSSELL; DELOREY; JOHNSON, 2013).

Assim sendo, proteínas do tipo HtrA em *Leptospira* poderiam ser as responsáveis pela atividade proteolítica sobre a molécula de trombina na presença de cálcio, uma vez que

existem 4 proteínas anotadas como pertencentes a esta família no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Portanto, o potencial proteolítico das proteínas HtrA recombinantes sobre a molécula de trombina será futuramente explorado.

4.6 Leptospiras recobertas por PLA são incapazes de degradar protrombina e trombina

O plasminogênio é um zimógeno glicoproteico sintetizado no fígado e que circula no plasma em uma concentração de aproximadamente 2,4 μM (BEZERRA et al., 1999), adotando uma conformação “fechada”, resistente à ativação. Quando ligado a diferentes receptores, como por exemplo, coágulo de fibrina, superfícies celulares ou receptores de patógenos, o plasminogênio passa a apresentar uma conformação “aberta” passível de conversão por diferentes enzimas, dentre as quais se destacam o tPA (ativador de plasminogênio do tipo tissular) e uPA (ativador de plasminogênio do tipo uroquinase) (LAW et al., 2012). Após clivagem por seus ativadores, o plasminogênio é convertido em plasmina, a principal enzima fibrinolítica.

Nosso grupo demonstrou a capacidade das leptospiras em capturarem o zimógeno do soro humano (VIEIRA et al., 2009), subverterem a maquinaria do hospedeiro e utilizarem ativadores do mesmo para converter o plasminogênio em sua forma enzimaticamente ativa, plasmina (VIEIRA et al., 2013), capaz de degradar várias moléculas do hospedeiro.

Pelo fato da plasmina ser uma serino protease de amplo espectro, avaliou-se se esta enzima, quando ligada à superfície das leptospiras, seria capaz de degradar as moléculas em estudo, trombina e protrombina. Conforme evidenciado na Figura 23, ambos os componentes se mantiveram íntegros após exposição à plasmina, semelhante aos controles negativos utilizados, nos quais pelo menos um dos componentes do sistema foi omitido.

Figura 23- Leptospiras recobertas com plasmina não degradam protrombina e trombina

A cepa virulenta *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 (10^9 /mL) foi tratada com 100 μ L de PBS com a adio de 10 μ g de plasminognio (PLG), 3U de uroquinase (uPA) ou ambos PLG e uPA (gerando plasmina na superfcie das bactrias). Controles faltando um dos componentes foram empregados. As leptospiras foram ressuspensas em 100 μ L PBS contendo 0,1% BSA e protrombina (40 μ g/mL) ou trombina (20 U/mL); as misturas foram incubadas por 7 horas a 37 C. As suspenses foram separadas por SDS-PAGE e ento transferidas para membrana de nitrocelulose. A deteco dos componentes foi feita com anticorpos anti-trombina (1:4.000).

4.7 Identificao de receptores de trombina em extrato de *Leptospira*

Visando detectar bandas reativas com trombina em extrato de leptospiras virulentas, foi feito um experimento de *far-western blotting*. Sumariamente, as protenas totais da cepa virulenta L1-130 foram fracionadas em SDS-PAGE e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada e incubada com uma soluo de trombina humana. A deteco do componente ligado a possveis protenas da bactria foi feita utilizando-se anticorpos anti-trombina. Conforme mostrado na Figura 24, no foram detectadas bandas reativas, tanto no tratamento com trombina quanto no controle negativo. Este resultado sugere que a conformao dos ligantes de trombina um requisito para que a interao ocorra, uma vez que neste experimento as protenas de leptospira so submetidas a condies desnaturantes e redutoras.

De fato, Reisner e Straley (1992), ao realizarem um teste funcional da ligao de YopM de *Y. pestis* trombina, verificaram que apenas a protena ligante nativa, e no sua forma desnaturada por aquecimento, inibia a agragao plaquetria induzida por trombina, sugerindo que em condies desnaturantes a ligao abolida.

Figura 24- Identificação de bandas reativas com trombina em extrato proteico de *L. interrogans*

Leptospiras virulentas foram recuperadas do meio de cultura por centrifugação, lavadas e ressuspensas em PBS acrescido de tampão de aplicação em gel de poliacrilamida. As amostras foram fervidas por 10 minutos a 96 °C e então aplicadas em gel de poliacrilamida 12%. Foi utilizado um volume que caracterizaria um total de 10^9 células. Após corrida, as proteínas fracionadas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada com uma solução de PBS-T contendo 3% BSA. Após lavagem com PBS-T, as membranas foram incubadas com solução de trombina humana (40 U/mL) em PBS contendo 0.1% BSA, por 3 horas a 37 °C. Então, a detecção de possíveis bandas reativas foi feita por incubação com anti-trombina (1:4.000) seguido de anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:3.000).

4.8 Avaliação do efeito de agentes de *crosslink* na molécula de trombina

Não sendo possível detectar bandas reativas com trombina por meio da técnica de *far western*, possivelmente em virtude da natureza desnaturante da técnica empregada, foi utilizada a abordagem experimental de *crosslink*, ou seja, promover a ligação covalente entre trombina humana e os receptores na superfície das leptospiros vivas, para futura visualização das bandas por *western blotting*. Previamente ao experimento, foram testados diferentes tempos de incubação dos agentes com a molécula de trombina.

Logo após a adição de ambos agentes testados (BS3 e glutaraldeído) e imediata parada da reação, não foram verificadas bandas reativas em *western blotting* com anticorpos anti-trombina (Figura 25). O tratamento com BS3 fez com que o fundo do *western blotting* ficasse bastante manchado. Assim sendo, o uso de quaisquer agentes testados inviabilizariam a visualização da molécula de trombina.

Figura 25- Teste de efetividade dos agentes *crosslinkers* sobre a trombina

Trombina humana (10 U/mL) foi incubada com os agentes de *crosslink* hidrossolúveis BS3 (Bis[sulfosuccinimidyl] suberate, 5 mM, Sigma) e glutaraldeído (2%, Sigma) por até 2 horas. Após cada tempo de incubação, as reações foram paradas por meio da adição de Tris-HCl pH 8 (50 mM). As amostras foram fervidas e submetidas a SDS-PAGE. As proteínas contidas nos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose e a detecção da banda de trombina foi realizada com anticorpos específicos.

4.9 Identificação, clonagem e expressão de possíveis ligantes de trombina

Foram buscadas sequências de aminoácidos no banco de dados de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, depositadas no GenBank, que possuíam certa similaridade com a sequência da proteína ligadora de trombina YopM de *Yersinia pestis* (REISNER; STRALEY, 1992; SKRZYPEK; STRALEY, 1996). As proteínas selecionadas para estudo são codificadas pelos genes LIC10829 (91% de cobertura, 46% similaridade) e LIC11051 (77% de cobertura, 48% de similaridade), sendo que ambas apresentam domínios repetidos ricos em leucina, assim como a YopM. Estes domínios já foram identificados em proteínas de vírus, procariotos e eucariotos (KOBE; KAJAVA, 2001). Grande parte desses domínios está envolvida em interações proteína-ligante ou proteína-proteína, e muitas dessas proteínas contendo esses domínios estão envolvidas em vários processos biológicos, incluindo transdução de sinal, adesão celular e resposta imune inata (MIRAS et al., 2015).

Ambas as proteínas apresentam alta probabilidade de serem proteínas secretadas por diferentes algoritmos e não apresentaram sinais putativos de clivagem pelo aparato Sp (*signal peptidase*) nem peptídeo sinal identificado pelos softwares utilizados. Oligonucleotídeos foram utilizados para amplificação dos genes de interesse (Figura 26A), e os respectivos fragmentos foram clonados no vetor pGEM-T easy e subclonados no vetor de expressão pAE. Os clones positivos (pAE-LIC) foram confirmados por ensaio de restrição, utilizando-se as

enzimas que reconhecem os sítios de restrição adicionados aos oligonucleotídeos (Figura 26B e C) e por sequenciamento.

Figura 26- Análise da clonagem dos genes LIC10829 e LIC11051 em gel de agarose 1%

(A) *Amplicons* referentes aos genes LIC10829 (1) e LIC11051 (2). Clones presumivelmente positivo da construção pAE/LIC10829 (B) e LIC11051 (C) foram submetidos à análise após reação de digestão por enzimas de restrição que reconhecem especificamente os sítios acrescentados às extremidades 5' dos oligonucleotídeos utilizados para a reação de PCR. A seta indica a liberação do inserto no tamanho esperado.

A cepa de *E. coli* BL21 (DE3) *Star* pLysS foi transformada com as construções finais pAE/LIC10829 e LIC11051 e a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de IPTG ao meio de cultura. O sobrenadante e o *pellet* após indução foram analisados quanto à presença das proteínas em SDS-PAGE, conforme apresentado na Figura 27.

Figura 27- Análise da expressão das proteínas recombinante por SDS-PAGE

A expressão das proteínas recombinantes LIC10829 (A) e LIC11051 (B) foi avaliada nas cepas de *E. coli* BL21 (DE3) *Star* pLysS. 1, Sobrenadante não induzido; 2, Sobrenadante induzido com 0,01 mM de IPTG; 3, Sobrenadante induzido com 0,1 mM de IPTG; 4, Sobrenadante induzido com 1 mM de IPTG; 5, Fração insolúvel não induzida; 6, Fração insolúvel induzida com 0,01mM de IPTG; 7, Fração insolúvel induzida com 0,1 mM de IPTG; 8, Fração insolúvel induzida com 1 mM de IPTG. A seta indica a massa molecular esperada das proteínas recombinantes.

Verificou-se uma banda proeminente na altura de 45 kDa para a rLIC10829 (Figura 27A) e de uma banda mais discreta para a rLIC11051, próximo a 66 kDa (Figura 27B), sendo a expressão das proteínas recombinantes confirmada por western blotting utilizando-se anticorpos monoclonais anti-his (não mostrado). Ambas as proteínas foram purificadas da fração solúvel, após lise por sonicação, o que garante que estas mantêm sua conformação nativa.

As proteínas recombinantes purificadas foram empregadas para avaliação da ligação com trombina humana.

4.10 Screening de ligação das proteínas recombinantes à trombina humana

Foi demonstrado que as leptospiros apresentam uma ligação à trombina, sendo que a cepa virulenta é mais eficiente na captura deste componente, principalmente via exosítio I, o que demonstrou possuir potenciais implicações biológicas na patogênese da bactéria por meio da redução da formação do coágulo de fibrina. Este evento é um fator adicional na explicação do aparecimento de quadros hemorrágicos iniciais nas manifestações severas da doença, além de favorecer a disseminação da bactéria durante as fases iniciais.

Não sendo possível identificar bandas reativas à trombina no extrato proteico de leptospiros virulentos, foram empregadas proteínas recombinantes disponíveis em nosso laboratório para avaliação da interação com o componente de interesse, incluindo também as duas proteínas obtidas neste trabalho como prováveis ligantes, dado sua similaridade intermediária com a proteína ligadora de trombina YopM. Trombina humana foi imobilizada em placas de ELISA e então a estas foi adicionado 1 µg de cada proteína recombinante. A interação decorreu por 2 horas e a detecção das proteínas ligadas foi feita por meio de incubação com anticorpo monoclonal anti-his, que reconhece todas as proteínas recombinantes. Foi empregado BSA imobilizado como controle negativo de interação.

Foram feitos dois experimentos independentes, sendo um representativo apresentado na Figura 28. Das 15 proteínas testadas, 7 apresentaram ligação significativa à trombina, o que *a priori* denota certo grau de redundância funcional e reforça que a ligação a este componente possa ser importante na patogênese da bactéria.

Como muitos dos ligantes encontrados também já foram descritos como ligantes de plasminogênio, foi averiguada a possível contaminação das alíquotas de trombina comercial por plasminogênio, um componente abundante no plasma, o que poderia estar causando

resultados falso-positivos. Todavia, não foi detectada reatividade a partir da incubação com anticorpo específico anti-PLG em amostras de trombina imobilizadas, sugerindo fortemente a consistência dos resultados apresentados (dados não mostrados).

Figura 28- Screening de ligantes de trombina

Trombina humana (1 U/poço) foi imobilizada em placas de ELISA. Então, 1 µg de cada proteína recombinante foi adicionado por poço e as placas foram incubadas por 2 h a 37 °C. Após lavagem, a detecção da ligação foi feita por meio da incubação com anticorpo monoclonal anti-his conjugado com peroxidase (1:10.000). Os dados representam o valor da média ± desvio padrão de uma triplicata, e são representativos de dois experimentos independentes. Para análise estatística, a ligação das proteínas à trombina foi comparada com a ligação das mesmas ao BSA, pelo teste t-Student (**p<0,01).

4.11 Caracterização da especificidade de ligação entre as proteínas recombinantes e trombina humana e bloqueio da formação do coágulo de fibrina

As proteínas selecionadas como possíveis ligantes de trombina foram avaliadas quanto à especificidade de ligação. A trombina apresenta regiões distintas em sua estrutura que possibilitam o reconhecimento de substratos, por meio do exosítio I, e a clivagem dos mesmos, via sítio catalítico. Hirudina, um inibidor bivalente de trombina, se liga a esta via exosítio I e sítio catalítico, concomitantemente. O bloqueio de uma destas regiões acarreta na inatividade da enzima frente a seus substratos, como fibrinogênio, por exemplo. Assim sendo, a importância destas duas regiões na interação entre trombina e as proteínas recombinantes foi avaliada.

A trombina imobilizada em placas de ELISA foi previamente incubada por 1 hora a 37 °C com concentrações saturantes de hirudina. Como controle máximo de ligação entre as recombinantes e a trombina, não foi adicionado o inibidor bivalente. Nossos resultados

sugerem que todos os ligantes selecionados interagem com regiões biologicamente relevantes na molécula de trombina, uma vez que foi observada uma redução drástica da reatividade das recombinantes após incubação com o competidor (Figura 29), o que está em confluência com os resultados obtidos com células de leptospiros virulentas, uma vez que a adição de hirudina à solução de trombina praticamente aboliu a ligação da enzima à superfície das bactérias.

Figura 29- Influência do exosítio I e sítio catalítico na interação entre as proteínas recombinantes e a trombina

Trombina humana (1 U/poço) foi imobilizada em placas de ELISA. Após, 50 U/mL do inibidor bivalente hirudina foram adicionados para bloqueio do sítio catalítico e exosítio I, por 1 hora a 37 °C; então, 1 µg de cada proteína recombinante foi adicionado por poço e as placas foram incubadas por 2 h a 37 °C. A detecção da ligação foi feita pela incubação com anticorpo monoclonal anti-his conjugado com peroxidase (1:10.000). Os dados representam o valor da média ± desvio padrão de uma triplicata, e são representativos de dois experimentos independentes. Para análise estatística, a ligação das proteínas à trombina foi comparada nas situações de presença e ausência de hirudina (com e sem bloqueio, respectivamente), pelo teste t-Student (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001).

A interação das proteínas de *Leptospira* com exosítio I e/ou sítio catalítico poderia acarretar num impedimento da formação do coágulo de fibrina *in vivo*, quer por impedimento da interação com substratos, quer por bloqueio do sítio catalítico. Conforme mostrado na Figura 17, leptospiros virulentas interagem com a trombina majoritariamente via exosítio I.

Para corroborar esses resultados e validar o bloqueio dessas regiões, foi ensaiado se a ligação das proteínas recombinantes à trombina reduz a ação desta sobre o fibrinogênio. Como as proteínas estudadas estão contidas em diferentes tampões, isto poderia acarretar uma variabilidade na atividade da enzima. Assim sendo, as proteínas foram dialisadas em um tampão para padronização das soluções. O tampão recuperado após diálise foi empregado para preparo dos controles de trombina. Nossos resultados sugerem que embora as proteínas testadas interajam com a trombina via exosítio e/ou sítio catalítico, esta interação é de baixa afinidade, provavelmente deslocada pelo substrato de alta afinidade da enzima, o

fibrinogênio, pois praticamente nenhuma inibição da atividade da trombina foi observada após incubação com as recombinantes (Figura 30).

Figura 30- Efeito das proteínas recombinantes sobre atividade da trombina frente o fibrinogênio

As proteínas recombinantes utilizadas foram dialisadas em tampão PBS por 2 horas a 4 °C. Trombina humana (1,25 U/mL) foi incubada com 2 µM de cada proteína por 2 horas a 37 °C. Como controle, foi feita uma curva padrão com concentrações decrescentes da enzima, diluída em tampão recuperado dos frascos de diálise, para que houvesse máxima padronização do experimento. Dez µL das soluções foram dispostos em uma placa de ELISA, juntamente com 90 µL de uma solução de fibrinogênio humano (1 mg/mL). A reação de formação do coágulo se prolongou por 1 hora, sendo feitas leituras de 2 em 2 minutos, no comprimento de onda de 595 nm. O experimento foi realizado em triplicata e foi incluída uma curva padrão de diferentes concentrações de trombina, para se inferir a redução causada pela incubação com as proteínas recombinantes. Um controle negativo desprovido de trombina também foi incluído. Para análise estatística, a atividade da trombina após incubação com as proteínas foi comparada ao seu máximo de atividade no experimento pelo teste t-Student (*p<0,05).

Assim, sendo, uma abordagem experimental mais direta e válida para identificação de ligantes funcionais seria avaliar primeiramente se as proteínas recombinantes são capazes de inibir a atividade da trombina e, em caso, positivo, partir para a caracterização dessas interações. Esta foi a estratégia experimental adotada para o segundo lote de proteínas recombinantes disponíveis (Figura 31).

Todas as contrapartes nativas das proteínas recombinantes ensaiadas são expressas tanto na cepa patogênica atenuada quanto virulenta; como verificamos que a maior afinidade de ligação à trombina é apresentada pelas cepas virulentas, é provável que proteínas diferencialmente expressas nestas cepas sejam os ligantes de trombina com maior afinidade, capazes de reduzir sua atividade.

Figura 31- Avaliação da redução da atividade da trombina humana incubada com diferentes proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes utilizadas foram dialisadas por 2 horas a 4 °C. Trombina humana (1,25 U/mL) foi incubada com 2 µM de cada proteína por 2 horas a 37 °C. Como controle, foi feita uma curva padrão com concentrações decrescentes da enzima, diluída em tampão recuperado dos frascos de diálise, para que houvesse máxima padronização do experimento. Dez µL das soluções foram dispostos em uma placa de ELISA, juntamente com 90 µL de uma solução de fibrinogênio humano (1 mg/mL). Para análise estatística, a atividade da trombina após incubação com as proteínas foi comparada ao seu máximo de atividade no experimento pelo teste t-Student (*p<0,05).

De todas as proteínas recombinantes testadas, apenas a proteína Lsa23 (Figura 30) apresentou uma redução significativa, embora pouco expressiva, da atividade da enzima (cerca de 20% de redução). A Lsa23 trata-se de uma proteína multifuncional, já demonstrada como ligante de vários componentes do hospedeiro, como componentes da matriz extracelular e plasma, incluindo reguladores do complemento (SIQUEIRA et al., 2013), estando envolvida portando nos processos de colonização, invasão e evasão imune. A redução da atividade da trombina por essa proteína pode caracterizar um mecanismo facilitador da disseminação.

4.12 Expressão heteróloga da proteína referente ao gene LIC11360 (Lsa23) na cepa saprofítica *L. biflexa* e sua caracterização funcional

4.12.1 Determinação do sítio de início de transcrição para o gene *lipL32* em *L. interrogans*

Visando à expressão aumentada da proteína codificada pelo gene LIC11360 (Lsa23) na cepa saprofítica de *Leptospira*, adotou-se a estratégia de fusão genética entre o promotor forte e constitutivo do gene *lipL32*, presente em cepas patogênicas, e a região codificadora do gene de interesse. Para tal, a sequência correspondente ao promotor foi acrescentada à

extremidade 5' do oligonucleotídeo *forward* utilizado para a amplificação da região codificadora do gene LIC11360.

Assim sendo, o sítio de início de transcrição (TSS) do gene *lipL32* foi definido por experimentos de 5' RACE (do inglês *rapid amplification of cDNA ends*), para que, consequentemente, fossem definidos os elementos -10 e -35 do promotor e a região 5' não traduzida do RNAm.

Em suma, cDNA específico ao gene *lipL32* foi gerado por meio da utilização de um oligonucleotídeo específico (GSP1, *gene specific primer*) em uma reação de transcrição reversa, sendo o produto de reação purificado e submetido a uma reação de adição de cauda homopolimérica à sua extremidade 3' (correspondente à extremidade 5' do cDNA). Este cDNA é utilizado como molde para uma reação de PCR, utilizando um oligonucleotídeo específico ao gene (GSP2, a 3' de GSP1, chamado de *nested primer*) e um *primer* complementar à cauda homopolimérica. Os produtos de PCR foram ligados em um vetor de clonagem e os clones recombinantes foram submetidos a uma reação de sequenciamento.

Pela análise do cromatograma, a primeira base após a sequência da causa homopolimérica refere-se ao TSS. Para *lipL32*, foi definido que a primeira base transcrita é uma citosina, mostrada aqui em negrito, localizada na sequência GATTTTCCTAACTAA. Com base nesses resultados, as sequências correspondentes a região 5' UTR (região líder do mRNA) e elementos do promotor foram utilizados para a fusão genética com a região codificadora do gene de interesse.

4.12.2 Clonagem do gene LIC11360 controlado por diferentes promotores no vetor de expressão em *Leptospira* spp.

Dois diferentes promotores foram empregados para controlar a transcrição do gene LIC11360 (Lsa23): o primeiro foi o promotor nativo, obtido por PCR utilizando-se oligonucleotídeos desenhados para amplificar cerca de 200 pb a 5' do códon de iniciação e 100 pb a 3' do códon de terminação, para que se incluísse um possível terminador intrínseco de transcrição; outra estratégia adotada consistiu na fusão genética do promotor do gene *lipL32* à região codificadora da Lsa23, por meio de um oligonucleotídeo que começasse a amplificação no primeiro códon da Lsa23 e ao qual foi incluído a sequência promotora de interesse a 5' (pLipL32:Lsa23), com base nos resultados dos experimentos de RACE, abrangendo os elementos -10 e -35 e a região líder, correspondente à região não traduzida do mRNA.

A eficiência da reação de PCR foi verificada em gel de agarose 1%, sendo que fragmentos do tamanho esperado foram obtidos para as duas construções (Figura 32, 1100 pb para Lsa23 contendo o promotor endógeno e 800 pb para pLipL32:Lsa23). Os fragmentos de DNA foram recordados do gel, purificados, ligados no vetor PCRII e então os plasmídeos recombinantes foram digeridos com as enzimas SacI e XbaI para a liberação do inserto com extremidades coesivas, para ligação no vetor pMaOri previamente digerido com as mesmas enzimas.

Figura 32- Análise da amplificação do gene LIC11360 contendo diferentes promotores

Visualização do *amplicon* referente ao gene LIC11360 em gel de agarose 1%, contendo seu promotor endógeno (Lsa23) ou geneticamente fusionado com o promotor do gene *lipL32* (pLipL32:Lsa23).

As reações de ligação contendo pMaori e os insertos foram usadas para transformar células de *E. coli* $\pi 1$, as quais foram plaqueadas em placas LB contendo espectinomicina e dT. Não existindo um diferencial de seleção entre os plasmídeos contendo ou não o inserto, algumas colônias foram selecionadas para verificação. Suscintamente, as colônias selecionadas foram crescidas em meio LB líquido e as culturas saturadas foram utilizadas para extração plasmidial, seguida de ensaio de restrição. Conforme mostrado na Figura 33, todas as colônias selecionadas mostraram-se positivas para a presença do inserto de interesse, denotando uma alta eficiência de ligação.

As construções foram confirmadas por sequenciamento e então utilizadas para transformar a cepa conjugativa de *E. coli* $\beta 2163$, usada então para transferência dos plasmídeos para *L. biflexa* por conjugação.

Figura 33- Análise da reação com enzimas de restrição para confirmar a presença dos insertos no vetor pMaOri

Células de *E. coli* π 1 foram transformadas com as reações de ligação e então crescidas em placas LB contendo dT e espectinomicina. As colônias foram crescidas em meio líquido, seus plasmídeos foram extraídos e digeridos com as enzimas *SacI* e *XbaI*, para liberação dos insertos. Os perfis das reações de digestão foram visualizados em gel de agarose 1%. Os insertos referentes ao promotor endógeno e região codificadora (*Lsa23*) ou promotor do gene *lipL32* mais região codificadora (*pLipL32:Lsa23*) estão indicados.

Após uma semana de incubação das células transformadas de *L. biflexa* em placas contendo EMJH e espectinomicina, algumas colônias foram selecionadas para verificação da presença dos plasmídeos recombinantes por PCR, e então, um clone contendo cada construção foi selecionado para validação da transcrição gênica, por RT-PCR e qRT-PCR.

A amplificação por PCR usando cDNA de *L. biflexa* contendo os diferentes plasmídeos foi realizada e a visualização das reações em gel de agarose evidenciou a presença de uma banda de tamanho esperado apenas nas amostras RT+ (Figura 34A), indicando que o gene está sendo transcrito na cepa patogênica (linha 1), o que é esperado, e nas células da cepa saprofítica contendo os plasmídeos pMaOri/*Lsa23* (linha 2) e pLipL32:*Lsa23* (linha 3). Nenhuma amplificação foi observada nas amostras RT- e no controle negativo (DNA genômico de *L. biflexa*, linha 4); DNA genômico de *L. interrogans* foi empregado como controle positivo da reação de amplificação (linha 5).

Para corroborar esses resultados e eliminar a possibilidade de contaminação com DNA genômico nas amostras RT+, estas foram usadas como molde para uma reação de PCR contendo um oligonucleotídeo *forward* que se anela à região promotora do gene LIC11360 e o mesmo oligonucleotídeo reverso usado na reação mostrada na Figura 34A, ou seja, não é esperada amplificação nas amostras de cDNA. De fato, só foi verificada amplificação no controle positivo, contendo DNA genômico de *L. interrogans* (Figura 34B, linha 5).

Figura 34- Validação da transcrição do gene LIC11360 por RT-PCR

O RNAm foi indiretamente verificado por amplificação do cDNA total com oligonucleotídeos específicos ao gene LIC11360, incluindo amostras RT+ e RT- (A), assim como utilizando oligonucleotídeos que se anelam à região promotora e codificadora, apenas para amostras RT+ (B). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%. Como controle positivo e negativo de amplificação, foi empregado DNA genômico de *L. interrogans* (linha 5) e *L. biflexa* (linha 4), respectivamente. As linhas correspondem a cDNA de *L. interrogans* (1), *L. biflexa* contendo pMaOri/Lsa23 (2) ou *L. biflexa* contendo pMaOri/pLipL32:Lsa23 (3). Foi empregado um controle negativo sem DNA (C-).

A comparação entre os níveis transcricionais do gene referente à proteína Lsa23 sob diferentes promotores foi feita por *real-time* PCR; conforme mostrado na Figura 35, a utilização do promotor do gene *lipL32* ocasionou um aumento de 3 vezes na transcrição gênica, em comparação ao promotor nativo do gene LIC11360.

Figura 35- Avaliação dos níveis transcricionais de LIC11360 sob diferentes promotores

RT-qPCR (*real-time* PCR) foi feito em uma reação contendo cDNA, 200 nM de cada oligonucleotídeo e 10 μ l *SsoFast EvaGreen supermix*. Todas as reações foram feitas em triplicata em uma placa de 96 poços. Controles negativos sem cDNA foram empregados (controle sem molde), assim como controle usando amostras RT-. A expressão relativa entre os diferentes mutantes de *Leptospira* foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo o gene *rfb* utilizado como controle interno para normalização da expressão gênica. Os níveis de expressão entre os diferentes promotores foram comparados pelo teste-t Student (** $P < 0,01$).

Porém, uma vez que a proteína LipL32 é bastante abundante nas cepas patogênicas de *Leptospira* (MALMSTRÖM et al., 2009), níveis maiores de transcrição do gene LIC11360 sob o promotor *lipL32* eram esperados. Aparentemente, outros elementos a 5' das sequências consenso -10 e -35 são necessários para uma atividade transcricional completa.

Todavia, o fenótipo dos mutantes ensaiados em experimentos de resistência ao soro (Lsa23 interage com inibidores do complemento) e de localização celular sugere fortemente a expressão da proteína heteróloga na superfície de *L. biflexa* (dados não mostrados).

4.12.3 Avaliação do efeito da expressão heteróloga da proteína Lsa23 sobre a atividade da trombina

Uma vez que a proteína recombinante Lsa23 foi caracterizada como um ligante de trombina, capaz de reduzir sua atividade, mesmo que em pouca magnitude, foi avaliado se a expressão heteróloga da mesma na cepa saprofítica conferiria a esta uma maior habilidade em interferir na atividade da enzima. Para tal, células de *L. biflexa* expressando Lsa23 sob controle de diferentes promotores foram incubadas com trombina humana por 2 horas, previamante à adição de uma solução de fibrinogênio, sendo a formação do coágulo de fibrina monitorada; *L. biflexa* contendo o vetor pMaOri vazio foi empregada como controle.

Nas condições testadas, não foi observada redução significativa da atividade da trombina frente ao fibrinogênio em comparação ao controle negativo (Figura 36), possivelmente em virtude da baixa concentração da proteína heteróloga, uma vez que mesmo quando a proteína recombinante foi ensaiada com concentrações altas, apenas um efeito modesto foi observado. Nosso grupo irá empregar a metodologia de expressão heteróloga utilizando-se diferentes promotores para a validação de novos receptores de trombina.

Figura 36- Efeito de *L. biflexa* expressando Lsa23 sobre a atividade da trombina

Células de *L. biflexa* sorovar Patoc contendo ou vetor vazio ou diferentes construções do gene LIC11360 (Lsa23) foram ressuspensas em PBS contendo 0,1% BSA e 1,25 U/mL de trombina humana, a uma concentração final de 5×10^9 leptospiros/mL. Após duas horas de interação, 10 μ L das soluções foram dispostas em placas de ELISA juntamente com 90 μ L de fibrinogênio humano (1 mg/mL) e a formação do coágulo de fibrina transcorreu por 1 hora.

4.13 Soros de pacientes com leptospirose apresentam menor nível de inibição sobre trombina exógena

Visando-se elucidar os possíveis distúrbios coagulatórios que ocorrem no curso da leptospirose, foi avaliado o efeito da incubação com um *pool* de soros de pacientes acometidos com a doença sobre a atividade da trombina comercial humana; após a incubação da mesma com amostras de soro de pacientes não infectados, ou infectados na fase inicial e convalescente da doença, foi observado um padrão de menor inibição da formação do coágulo após a exposição à infecção.

Conforme mostrado na Figura 37, a enzima reteve cerca de 80% de sua atividade após incubação com soro de pacientes MAT+ e 40% com soro de pacientes MAT-. Em contraste, soro de indivíduos normais que nunca foram expostos à infecção por *Leptospira* mostrou total inibição da atividade da enzima (0% de atividade), sugerindo que algum mecanismo inibitório fisiológico da enzima decresce em virtude da leptospirose.

Foram empregadas amostras individuais de soros pareados (MAT- e seu correspondente MAT+, n=16) para se verificar a consistência dos resultados obtidos. Os valores de DO obtidos foram usados para se inferir a porcentagem de inibição das amostras de soro sobre a trombina exógena (1,25 U/ml). De acordo com os resultados mostrados na Figura 38, os soros de indivíduos sadios apresenta uma elevada inibição sobre a enzima, o que denota níveis elevados e fisiológicos de inibidores de trombina, com uma média de inibição igual a

93%. Os valores individuais de inibição obtidos foram utilizados para cálculo de um valor *cutoff*, para se considerar um limítrofe dos níveis inibitórios normais dos soros sobre a trombina.

Figura 37- Efeito de soros de pacientes com leptospirose sobre a atividade da trombina exógena

(A) Trombina humana (1,25 U/mL, considerado aqui 100% de atividade) foi incubada por 2 horas a 37 °C com uma mistura de soros de pacientes com leptospirose na fase inicial (MAT-) e convalescente (MAT+), diluídos 40X em PBS contendo 0,1% BSA. Amostras de soros de indivíduos saudáveis e soros normais comerciais foram utilizados como controle. Dez µL das misturas incubadas foram dispostas em placas de ELISA juntamente com 90 µL de uma solução de fibrinogênio humano (1 mg/mL). Os experimentos foram realizados três vezes, cada vez em triplicata, sendo as leituras de densitometria feitas a 595 nm a cada 2 minutos, para se mensurar a formação do coágulo de fibrina. No controle negativo, a trombina foi omitida. Uma curva de diferentes concentrações de trombina foi empregada para se comparar o nível de redução ocasionado pela incubação com as amostras. (B) Valores da atividade da enzima mantida após a incubação com as amostras. Para as análises estatísticas, foi realizado ANOVA, seguindo do pós-teste de Tukey para comparação das médias (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

Os resultados obtidos com as amostras MAT- mostram que 68% dos indivíduos ensaiados apresentam níveis séricos anormais (abaixo do valor *cutoff*) de inibidores de trombina, com uma média de inibição de 55%, que foi estatisticamente significativa em relação às amostras de indivíduos saudáveis ($p < 0,05$); nas amostras MAT+, todos os pacientes testados apresentaram níveis diminuídos dos inibidores, conforme demonstrado pela baixa inibição média dessas amostras sobre a trombina exógena, de apenas 30%. Foram observadas diferenças significativas dos níveis médios de inibidores de amostras MAT+ em relação a amostras de indivíduos saudáveis e MAT- ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Esses dados são consistentes e representativos dos valores obtidos com o *pool* de amostras (Figura 37).

Os valores de inibição das amostras pareadas estão mostrados na Figura 38B; o perfil mais frequente (56%) foi níveis séricos ainda altos de inibidores de trombina na fase inicial da doença e então uma diminuição dos mesmos. Em alguns casos, os inibidores de trombina já estavam bem diminuídos na fase inicial (25%), o que pode estar relacionado à resposta

bastante heterogênea entre diferentes pacientes. De fato, em um caso, um paciente mostrou uma tendência à normalização dos níveis de inibidores. Não foi observada correlação entre os níveis de inibição de trombina e os títulos do MAT.

Figura 38- Comparação do efeito inibitório individual de soros de pacientes na fase inicial e convalescente da leptospirose sobre a trombina exógena

(A) Trombina humana (1,25 U/mL) foi incubada por 2 horas a 37 °C com soros pareados de pacientes na fase inicial (MAT-, n=16) e convalescente (MAT+, n=16), diluídos 40X em PBS contendo 0,1% BSA. Soros de indivíduos saudáveis foram empregados como controle (n=8). Dez µL das misturas incubadas foram dispostos em placas de ELISA juntamente com 90 µL de uma solução de fibrinogênio (1 mg/mL). O experimento foi realizado em triplicata e a leitura foi feita no comprimento de onda de 595 nm. Uma curva de concentração de trombina foi utilizada para inferir a atividade da trombina após incubação com os soros. O valor *cutoff* (linha pontilhada) para a inibição provocada por soros normais foi calculado com base na média da inibição provocada por essas amostras subtraída de três desvios padrões. A comparação entre os valores médios de inibição de trombina (linha sólida) foi feita por ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey (*P<0,05 e **P<0,01). (B) Valores de inibição sobre a trombina exógena após incubação com as amostras pareadas MAT- e MAT+. Teste-t foi usado para comparação (*P<0,05).

Existe uma forte relação entre a cascata de coagulação e inflamação em resposta a uma infecção severa, podendo culminar em uma coagulação intravascular disseminada (CID) e

falência múltipla dos órgãos (LEVI; DE JONGE; VAN DER POLL, 2003). A ativação sistêmica da coagulação é contrabalanceada por diversos mecanismos. Inibidores de coagulação estão presentes para reduzir os mecanismos coagulatórios. Existem vários inibidores solúveis, sendo a antitrombina o mais importante, a qual forma um complexo 1:1 com a trombina, bloqueando sua atividade, e níveis plasmáticos e séricos reduzidos deste inibidor são encontrados em pacientes com sepse (MESTERS et al., 1996).

Alguns autores sugerem o desenvolvimento de CID no curso da leptospirose (CHIERAKUL et al., 2008; DA SILVA et al., 1995). Um dos indicadores deste quadro é a redução de antitrombina, o que propiciaria ou seria reflexo de uma coagulação desenfreada e sem regulação final, com constante consumo dos componentes da cascata de coagulação. A presença de antitrombina em soro de pacientes diagnosticados com leptospirose foi investigada, em comparação com os níveis encontrados em indivíduos normais, por meio de anticorpos que reconhecem o componente.

Utilizando-se uma mesma quantidade de um *pool* de soros de pacientes na fase inicial e convalescente da doença (Figura 39A), pode-se observar uma redução expressiva dos níveis de antitrombina nas amostras em estudo, sendo esta redução mais pronunciada na fase convalescente da doença (Figura 39B, AT), o que está de acordo com os menores níveis de inibição sobre a trombina exógena exercida por estas amostras, sendo esta correlação confirmada a partir da utilização de amostras pareadas individuais (Figura 39C, números correspondentes aos mesmos pacientes apresentados na Figura 38B), ou seja, quanto menor a inibição exercida por estes soros sobre a trombina exógena, menores são os níveis de antitrombina observados. Uma banda próxima a 45 kDa foi observada em algumas amostras (Figura 39B e C, *), mesmo quando o anticorpo primário foi omitido da reação, constituindo-se, portanto, de uma reação inespecífica ao anticorpo secundário.

Wagennar et al. (2010) já haviam relatado uma redução dos níveis de antitrombina em pacientes com leptospirose severa; ademais, alguns autores sugerem que uma rápida depleção deste componente no soro está associada a um prognóstico ruim em humano quanto a manifestações hemorrágicas (LEVI, 2010).

Nossos resultados sugerem que a tendência é se observar uma diminuição dos níveis séricos (e consequentemente plasmáticos) de antitrombina no curso da infecção. Este efeito pode ser devido à resposta inflamatória em si, ou seja, indireto, ou por meio da interação da bactéria com o componente, quer seja por meio da ligação, quer seja por meio da degradação, o que culminaria na redução dos níveis circulantes do inibidor.

Figura 39- Redução dos níveis de antitrombina em pacientes com leptospirose

Proteínas contidas em 0,25 μ L de soro de indivíduos normais (saudáveis), MAT- (fase inicial da doença) e MAT+ (fase convalescente da doença) foram separadas em gel de poliacrilamida 12%. Em (A) as membranas foram coradas com *Ponceau* para controle da massa de proteínas carregadas. (B) As membranas foram bloqueadas e então incubadas com anticorpos anti-antitrombina desenvolvidos em coelho (1:3.000 em PBS-T 1% leite) seguido de incubação com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:4.000). O asterisco (*) denota reatividade cruzada do anticorpo secundário com alguma proteína sérica. A reatividade das proteínas foi revelada com uso do substrato quimioluminescente ECL. Antitrombina purificada de soro humano (1 μ g, AT) foi empregada como controle positivo da reação. Em (C), a presença de antitrombina foi avaliada em diferentes amostras pareadas, sendo os números das amostras correspondentes aos pacientes apresentados na Figura 38B.

4.14 Diferentes cepas de *Leptospira* são incapazes de se ligar à antitrombina

Uma vez que foram observados níveis diminuídos de antitrombina em amostras de soro de pacientes acometidos pela leptospirose, foi avaliado se essa redução seria em virtude de um efeito direto das bactérias, por meio de ligação e/ou degradação do componente. Portanto, foram utilizadas diferentes cepas de leptospiros disponíveis para inferir se a ligação, caso ocorra, está relacionada à virulência.

Três cepas virulentas (LPF, L1-130, L04), uma patogênica atenuada em cultura (M20) e uma saprofítica (Patoc-1) foram incubadas com o componente em fase solúvel, conforme anteriormente descrito. Transcorridas 2 horas de interação, as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante, *pellet* e *pellet* lavado foram coletados e avaliados quanto à presença do componente. Como mostrado na Figura 40, após incubação com as cepas testadas, toda antitrombina foi detectada no sobrenadante (SN), denotando a ausência de ligação, o que é corroborado pela ausência de reatividade no *pellet* e *pellet* lavado (P e P*, respectivamente).

Figura 40- Avaliação da ligação de leptospiros à antitrombina

Diferentes cepas de *Leptospira* (5×10^9 células/mL) foram incubadas com 100 μ L de PBS contendo 1 μ g de antitrombina por 2 horas a 37 °C. As misturas foram centrifugadas a 4.000 x g por 15 minutos e submetidas a SDS-PAGE (12%) da seguinte maneira: sobrenadante, *pellet* e *pellet* após lavagem com 1 mL de PBS. As proteínas fracionadas foram transferidas para membranas de nitrocelulose para detecção da banda de antitrombina por *western blotting*, por meio de incubação com anticorpos anti-antitrombina (1:3.000) e anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:4.000).

4.15 Leptospiros virulentas são pouco eficientes na degradação da antitrombina

Como foi verificado um potencial proteolítico de leptospiros virulentas sobre a trombina na presença de cálcio, verificou-se se o mesmo aconteceria para a antitrombina. Após incubação com antitrombina em um tampão contendo íons cálcio, a cepa virulenta L1-130 foi capaz de promover apenas uma ligeira degradação do componente, notado pela menor reatividade no sobrenadante da cultura incubada (Figura 41A, linha 3). Ademais, antitrombina

foi verificada apenas no sobrenadante, fortalecendo os dados de ausência de ligação das leptospiros à mesma. Resultados semelhantes foram obtidos com a cepa LO4.

Foi explorado também o potencial do sistema PLG/PLA na degradação do componente em questão. Após incubação com PLG e seu ativador, uPA, PLA ligada à superfície das bactérias foi apenas parcialmente capaz de degradar a antitrombina após 16 horas de incubação (Figura 41, seta). Não foi observada degradação quando pelo menos um dos componentes foi omitido da reação.

A despeito desta modesta degradação promovida pelos dois sistemas explorados, acreditamos que outros mecanismos mais relevantes sejam subjacentes à diminuição dos níveis de inibidores de trombina no soro de pacientes com leptospirose, uma vez que os níveis mais reduzidos de antitrombina são observados na fase da doença na qual as leptospiros estão alojadas nos túbulos renais, não havendo contato direto com os componentes do hospedeiro.

Figura 41- Avaliação do potencial proteolítico das leptospiros sobre a antitrombina

(A) Antitrombina (10 µg/mL) foi incubada com 10^9 células/mL da cepa virulenta *L. interrogans* sorovar Copenhageni FIOCRUZ L1-130 em tampão PBS (1), Tris-NaCl (1) (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8.3) ou Tris-NaCl contendo 10 mM CaCl_2 (3). Após 16 horas de incubação à temperatura ambiente, as soluções foram centrifugadas (5.000 g por 15 minutos), e ambos sobrenadante e *pellet* coletados para avaliação. As proteínas foram separadas por corrida em gel de poliacrilamida e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose, na qual foram incubadas com anticorpos anti-antitrombina (1:3.000), seguido de anticorpos anti-IgG de coelho conjugados com peroxidase (1:4.000). **(B)** A cepa FIOCRUZ L1-130 (10^9 leptospiros/mL) foi tratada com 100 µL de PBS com adição de 10 µg de plasminogênio (PLG), 5 µg de uroquinase (uPA) ou ambos. Controles faltando algum ou ambos os componentes foram empregados. As bactérias foram incubadas por 2 horas a 37 °C com PLG, e por mais 2 horas após a adição de uPA. Então, as leptospiros foram ressuspensas em 100 µL de PBS contendo antitrombina (10 µg/mL) e as misturas foram deixadas interagindo por 16 horas à temperatura ambiente. As suspensões foram separadas por SDS-PAGE 12% e as proteínas fracionadas transferidas para membrana de nitrocelulose. A detecção do componente em estudo foi feita com anticorpos específicos.

4.16 Menores níveis de protrombina durante a leptospirose podem estar relacionados ao quadro hemorrágico

É bem consolidado na literatura que a ativação da cascata de coagulação por micro-organismos e inflamação leva a um consumo exacerbado de fatores de coagulação, incluindo inibidores, igualmente consumidos neste processo (LEVI, 2010). Portanto, foi verificado se o decréscimo de antitrombina era acompanhado pela redução dos níveis circulantes de protrombina, o que estaria de acordo com o maior tempo de protrombina em pacientes com leptospirose (CHIERAKUL et al., 2008).

Misturas de soro humano normal ou na fase inicial e convalescente da doença foram empregadas como fonte de protrombina para sua conversão em trombina e subsequente detecção de sua atividade. Após incubação do soro com FXa, o qual converte protrombina em trombina, um substrato cromogênico foi adicionado, para se aferir a atividade da trombina formada e indiretamente os níveis de protrombina. Conforme mostrado na Figura 42, apenas soro normal apresentou uma atividade elevada e estatisticamente significativa ($P < 0,01$), o que denota elevados níveis de protrombina nessa amostra. Soros da fase inicial (MAT-) e convalescente (MAT+) não apresentaram atividade de trombina significativa, indicando que os níveis de protrombina nessas amostras estão drasticamente reduzidos devido à infecção por *Leptospira*. Controles faltantes de pelo menos um componente da reação não apresentaram atividade significativa, exceto o tratamento composto por soro normal e substrato (sem FXa), que mostrou um leve aumento de sinal, possivelmente devido à ativação da via intrínseca da cascata de coagulação.

Para fortalecer e corroborar esses achados, foi realizado um *western blotting* para se verificar a presença de protrombina em amostras de soro humano, por meio da utilização de anticorpos anti-F2 (anti-protrombina). Conforme evidenciado na Figura 42B, a banda de protrombina (~72 kDa) foi detectada apenas em soro humano normal; ademais, banda referente ao fragmento de ativação F1+2 (resultante da ativação *in vivo* da protrombina) não foi observada. Não foi verificada a banda de protrombina nas amostras de soro de pacientes na fase inicial ou convalescente; entretanto, nestas amostras, o fragmento F1+2 foi detectado, eminentemente na amostra de soro MAT+, sugerindo que uma elevada ativação da cascata de coagulação ocorre no curso da leptospirose; níveis aumentados de F1+2 também foram observados por Chierakul et al. (2008).

A avaliação dos níveis de protrombina em diferentes amostras pareadas de soro de pacientes com leptospirose (n=16) revelou um perfil bastante semelhante; foi utilizado FXa

para transformar a protrombina sérica em trombina, cuja atividade foi medida pelo uso de um substrato cromogênico. O valor *cutoff* (linha pontilhada) foi calculado com base nos níveis indiretos de protrombina de um conjunto de amostras de indivíduos saudáveis (n=8) e foi estabelecido como 3 desvios padrão abaixo do valor médio apresentado. Níveis diminuídos de protrombina (abaixo do valor *cutoff*) foram observados em 68 e 56% de pacientes MAT- e MAT+, respectivamente (Figura 42C).

Figura 42- Menores níveis de protrombina em soro humano estão relacionados com uma ativação *in vivo* da protrombina

(A) Um μL de amostras de soro humano (normal, MAT- e MAT+) foi diluído em 50 μL de PBS contendo 0,25 μL de Fator Xa. Após 1 hora de incubação a 37 °C, 50 μL de substrato cromogênico de trombina foram adicionados à mistura e 100 μL totais foram dispostos em uma placa de ELISA para leitura da densidade óptica a 405 nm após 20 minutos. Foram empregados controle faltando FXa, substrato de trombina ou amostra de soro. Os experimentos foram feitos em triplicata. A detecção de protrombina também foi feita por *western blotting* (B): 0,25 μL de amostras de soro humano foram separadas em SDS-PAGE e as proteínas transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A detecção de protrombina (PT) e do fragmento de ativação (F1+2) foi feita pelo uso de anticorpos anti-protrombina (1:3.000) seguido de anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase. Em (C), a detecção de protrombina em diferentes amostras pareadas de soro e o valor *cutoff* (linha pontilhada) foi calculado com base nos níveis indiretos de protrombina de um conjunto de amostras de indivíduos saudáveis (n=8) e foi estabelecido como 3 desvios padrão abaixo do valor médio apresentado.

Estes resultados, em conjunto com os menores níveis de antitrombina, fortemente sugerem um consumo dos fatores de coagulação, bem característico de um quadro de coagulação disseminada.

4.17 Correlação entre os níveis de protrombina e inibidores de trombina em soro de pacientes com leptospirose

Os valores individuais de porcentagem de inibição sobre a trombina e dos níveis de protrombina no soro das amostras de indivíduos saudáveis e com leptospirose foram utilizados para se averiguar a correlação entre estes indicadores. Para tal, os dados foram plotados em um gráfico de dispersão, no qual os valores *cutoff* também foram representados (linhas tracejadas), delimitando quatro quadrantes, a saber: I, níveis normais de inibidores de trombina e baixos de protrombina; II, níveis baixos tanto de protrombina quanto de inibidores de trombina; III, níveis baixos de inibidores e normais de protrombina; e IV, níveis normais de ambos os indicadores.

Conforme mostrado na Figura 43, apenas as amostras de indivíduos saudáveis se localizaram no quadrante IV, ou seja, valores acima dos *cutoffs* para os dois indicadores, e, portanto, considerados normais. Interessantemente, todos os pacientes com leptospirose, tanto na fase inicial quanto na convalescente, apresentaram pelo menos um dos indicadores abaixo do valor *cutoff* e, portanto, considerado baixo ou anormal.

No que tange ao quadrante II, no qual ambos os indicadores estão abaixo do normal, indicando um grande desbalanço coagulatório, foram localizados 43% e 56% dos indivíduos MAT- e MAT+, respectivamente, podendo estes indicadores estarem relacionados à severidade da doença, indicando uma ativação da coagulação.

Figura 43- Correlação entre os níveis de protrombina e inibidores de trombina em amostras de soro.

Gráfico de dispersão no qual estão plotados os níveis de protrombina em função da densidade óptica do experimento de detecção (eixo das abcissas) e níveis de inibição de trombina (eixo das ordenadas) de diferentes amostras de soro de pacientes com leptospirose na fase inicial (MAT-) e convalescente (MAT+) e indivíduos saudáveis (normal). Os valores *cutoff* estão representados (linhas tracejadas), delimitando quatro quadrantes: I, níveis normais de inibidores de trombina e baixos de protrombina; II, níveis baixos tanto de protrombina quanto de inibidores de trombina; III, níveis baixos de inibidores e normais de protrombina; e IV, níveis normais de ambos os indicadores.

4.18 Detecção de PAI-1 em soro de pacientes com leptospirose

Uma inflamação sistêmica pode causar anormalidades em relação à coagulação sanguínea e fibrinólise, variando de uma ativação sutil da coagulação e fibrinólise até um quadro mais complexo de coagulação intravascular disseminada, caracterizado por uma trombose microvascular sistêmica e hemorragia (LEVI et al., 1993). O evento chave subjacente a essa complicação é a resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro contra o agente infeccioso (SEMERARO et al., 2012).

Vários tipos celulares, incluindo as células endoteliais, produzem uma molécula chamada Inibidor do Ativador de Plasminogênio tipo I (PAI-1, do inglês *plasminogen activator inhibitor-1*), o qual especificamente regula a fase inicial da fibrinólise por inibir os ativadores de plasminogênio. PAI-1 inibe eficientemente tPA (ativador do tipo tecidual) e uPA (ativador do tipo uroquinase) (BINDER et al., 2002), formando um complexo 1:1, funcionando como uma molécula reativa de fase aguda, cujos níveis são aumentados durante uma resposta inflamatória (EMEIS; KOOISTRA, 1986).

Portanto, os níveis circulantes de PAI-1 em soro de indivíduos saudáveis e acometidos por leptospirose, tanto na fase inicial quanto convalescente da doença, foram analisados. Utilizando-se um kit comercial de ELISA sanduíche, após comparação com uma curva padrão de concentrações conhecidas, foram definidas as concentrações do inibidor no *pool* de amostras.

Como ilustrado na Figura 44, durante a fase inicial da leptospirose, foi observada uma redução significativa ($P<0,01$) dos níveis de PAI-1. Essa redução pode estar relacionada à maior atividade dos ativadores de plasminogênio encontrada por Viera et al. (2013), sobretudo na fase inicial da doença. Bacteremia e endotoxemia experimentais resultam em um aumento imediato da atividade fibrinolítica, o que pode estar relacionado à menor concentração sérica de PAI-1 encontrada em nossos resultados na fase inicial da doença; essa atividade pró-fibrinolítica é seguida de uma supressão da atividade fibrinolítica em virtude de um aumento contínuo dos níveis plasmáticos de PAI-1 (BIEMOND et al., 1995; LEVI, 2005b; VAN HINSBERGH et al., 1990).

Figura 44- Quantificação dos níveis de PAI-1 em soro de pacientes com leptospirose

Amostras de indivíduos saudáveis ou acometidos por leptospirose na fase inicial (MAT-) e convalescente (MAT+) foram diluídas 100X e incubadas em placa de ELISA pré-imobilizada com anticorpo de captura anti-PAI-1. Juntamente às amostras, foi utilizada uma curva padrão contendo diferentes concentrações do componente em estudo. Após 2 horas de incubação, a placa foi lavada e então incubada com o anticorpo de detecção conjugado à biotina por mais 1 hora. A seguir, a presença do componente foi indiretamente medida pela incubação com estreptoavidina conjugada à peroxidase e adição de substrato cromogênico TMB.

Consistentemente, na fase convalescente da doença, foi observado um aumento expressivo e significativo nos níveis circulantes do inibidor ($P<0,01$), sendo quase o dobro no valor encontrado em indivíduos saudáveis. Vários estudos tem mostrado que o aumento dos

níveis de PAI-1 resulta em um desligamento do sistema fibrinolítico durante endotoxemia ou sepse (LEVI, 2010). Níveis altos desta molécula têm sido correlacionados com prognósticos ruins durante sepse, uma vez que a supressão da fibrinólise é um dos eventos iniciadores da falência múltipla dos órgãos durante a CID em resposta a uma inflamação (MADOIWA et al., 2006). Estudos apontam que em pacientes com CID, um nível plasmático alto de PAI-1 é um dos principais indicadores de morte (HERMANS et al., 1999; LEVI et al., 1999). Estes resultados fortalecem a ativação da coagulação em virtude de uma inflamação exacerbada durante a leptospirose.

4.19 Manifestações hemorrágicas em hamsters infectados com diferentes cepas de *Leptospira* estão relacionadas a um decréscimo de fatores de coagulação

Hamsters foram infectados com as amostras virulentas *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm (LPF, perfil heterogêneo de hemorragia nos animais) e *L. interrogans* sorovar Canicola cepa LO4 (LO4, bastante hemorrágica), sendo então monitorados até que os sintomas clínicos de doença terminal aparecessem. Soro foi coletado em diferentes momentos da infecção e animais inoculados com solução salina foram utilizados como controle. O perfil de morte dos animais está mostrado na Figura 45A.

Quanto à infecção com a cepa LPF, os animais apresentaram uma cinética da doença bem heterogênea; o animal infectado 4 (IA4) morreu rapidamente e apresentou diversos focos hemorrágicos, sangue no trato urinário, icterícia leve e soro bastante hemolisado. O animal infectado 1 morreu no início do dia 10 e não apresentou sinais observáveis de hemorragia. O animal 2 morreu no dia 12 ou início do dia 13, e quando o soro foi coletado no dia 11, sintomas da doença foram observados, especialmente hemorragia. O animal 3 apresentou sintomas brandos no dia 11, todavia foi capaz de se recuperar da doença, estando completamente sadio ao final do período de observação, no dia 21. Essa heterogeneidade de sintomas causada pela infecção com a cepa LPF é rotineiramente observada em nosso laboratório.

Os animais infectados com a cepa LO4 apresentaram uma cinética mais homogênea de mortalidade (Figura 45A); três animais morreram no dia 10, e o animal 3 morreu ao oitavo dia. Cabe ressaltar que todos os animais apresentaram intenso quadro hemorrágico, sangue na urina e icterícia; neste experimento, todos os animais foram positivos para a presença de leptospirose nos rins, independentemente da cepa utilizada.

Figura 45- Hemorragia durante a infecção por *Leptospira* em hamster é fortemente relacionada à redução de protrombina e de inibidores de trombina no soro

(A) Curva de sobrevivência apresentada pelos animais após infecção com *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Pomona Fromm (LPF) ou *L. interrogans* sorovar Canicola cepa LO4. (B) Trombina (1,25 U/mL) foi incubada por 2 horas a 37 °C com as amostras de soro dos animais diluídas 40X em PBS contendo 0.1% BSA, colhidas no dia 0 e no último dia de análise (D*). Dez µL das reações foram colocadas em placas de ELISA juntamente com 90 µL de fibrinogênio humano (1 mg/mL). O experimento foi feito três vezes, cada vez em triplicata, e as leituras das placas foram feitas no comprimento de onda de 595 nm a cada 2 minutos, para se medir a formação do coágulo de fibrina. Os valores apresentados pelas amostras no D* foram comparados àqueles no dia 0, pelo test-t Tukey (**P<0,01 e ***P<0,001). (C) Um µL de amostras de soro de hamster (Dia 0 e último dia de análise, D*) foi diluído em 50 µL de PBS contendo Fator Xa. Após 1 hora de incubação a 37 °C, 50 µL de substrato cromogênico de trombina foram adicionados à mistura e 100 µL totais foram dispostos em uma placa de ELISA para leitura da densidade óptica a 405 nm após 20 minutos. Foi empregado um controle sem amostra de soro, utilizado como branco da reação. Os experimentos foram feitos em triplicata e os valores de absorvância apresentados pela amostra no D* foram comparadas com aquelas no dia 0, pelo test-t Tukey (**P<0,01 e ***P<0,001). Estes experimentos são representativos de dois experimentos independentes.

O soro dos animais não infectados (controle) apresentou o mesmo perfil inibitório alto sobre a trombina exógena no primeiro e último dia de análise (D0 e D*, correspondendo ao

dia destacado na Figura 45A) (Figura 45B). Os animais infectados pela cepa LPF foram heterogêneos quanto à inibição sérica sobre a trombina, o que está de acordo com os diferentes perfis de morte observados. Os animais 2 e 4, os quais sucumbiram à leptospirose hemorrágica, apresentaram menor inibição sobre a enzima no último dia da infecção ($P < 0,01$ e $0,001$, respectivamente). Os soros dos animais 1 e 3 não apresentaram menor inibição sobre a trombina exógena, sugerindo que não existe o consumo de inibidores de coagulação; o animal 1 não apresentou sinais de hemorragia e o animal 3 sobreviveu à infecção. Vale ressaltar que o soro do animal 3 ao final do experimento (dia 21) apresentou o mesmo perfil de inibição que os controles não infectados (dados não mostrados).

Todos os animais infectados com a cepa LO4 apresentaram menor inibição sobre a trombina ao último dia de análise (D*) (Figura 45B). Esses resultados corroboram a verificação de que a hemorragia é relacionada com uma redução dos níveis circulante de inibidores de trombina.

Foi investigado se essa redução de inibidores de trombina, possivelmente antitrombina como demonstrado em amostras humanas, estaria correlacionada com uma redução dos níveis de protrombina. O soro dos animais foi incubado com FXa e então um substrato cromogênico de trombina foi adicionado. Após 20 minutos de revelação, as densidades óticas foram lidas. Foi empregado um controle no qual foi omitido o substrato, para se descontar a coloração basal do soro, especialmente daqueles provenientes de animais ictericos. Conforme mostrado na Figura 45C, os mesmos animais que apresentaram menor inibição sobre a trombina exógena também apresentaram menores níveis de protrombina, sugerindo um desbalanço e consumo de fatores de coagulação em virtude de uma ativação da coagulação, em acordo com os resultados obtidos em amostras de soro humano.

A existência ou não de ativação da coagulação em modelo animal é ainda um pouco controversa na literatura; um estudo conduzido por Higgins e Cousineau (1977) demonstrou que trombocitopenia, aumento dos tempos de coagulação e protrombina e redução dos níveis de fibrinogênio, FV e FVIII em porquinhos-da-índia infectados com *Leptospira* eram devidos à CID. Em seguida, análises patológicas e hematológicas no mesmo modelo animal infectado com *Leptospira* indicaram que a trombocitopenia não se correlacionava com a existência de CID (YANG et al., 2006b). Outro estudo feito por Silva et al. (1995) concluiu que as observações clinico-laboratoriais nos animais infectados são compatíveis com as observações de CID.

Nossos resultados indicam uma coagulação ativada no modelo animal empregado, mas cabe ressaltar que as manifestações clínicas são bastante dependentes da cepa utilizada para a infecção, a dose do inóculo, bem como componentes genéticos intrínsecos a cada animal, uma vez que o modelo de hamster apresenta alta heterozigose populacional. Mesmo quando amostras de soros humanos são analisadas, percebe-se uma elevada variabilidade dos parâmetros estudados, o que pode estar relacionado às distintas formas de manifestação da doença.

4.20 Avaliação do papel da inflamação sobre o aparecimento de quadros hemorrágicos

4.20.1 Avaliação do perfil mitogênico e inflamatório de diferentes cepas de *Leptospira* spp. em esplenócitos murinos

Ao contrário dos hamsters, que são suscetíveis à leptospirose, camundongos são considerados hospedeiros de colonização de leptospiros, não sendo acometidos pela doença, e, portanto, assintomáticos (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001). Porém, uma das problemáticas do modelo animal suscetível é a carência de kits comerciais para detecção de diversos componentes, como citocinas, por exemplo. Assim sendo, a avaliação do perfil inflamatório de diferentes cepas de *Leptospira* foi realizada em esplenócitos murinos, para que pudéssemos ter uma aproximação do que aconteceria em células de hamster.

Brevemente, camundongos BALB/c *naïve* foram eutanasiados e seus baços removidos assepticamente para extração das células e realização de cultura celular primária. Para análise da proliferação celular, os esplenócitos foram dispostos em placas de cultura celular de 96 poços, totalizando 5×10^5 células/poço, as quais foram mantidas em atmosfera umidificada por 24 horas e então estimuladas por diferentes tempos (0-16 horas) com 5×10^7 leptospiros inativadas quimicamente, em triplicata. Ao fim dos estímulos, foi adicionado o análogo de base BrdU para incorporação no DNA genômico, por 2 horas, sendo então as placas centrifugadas e a proliferação celular foi acessada com utilização do kit comercial contendo anticorpos anti-BrdU. Foram empregadas as cepas virulentas *L. interrogans* sorovares Canicola (cepa LO4) e Kennewicki (cepa Pomona Fromm) e a cepa saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1.

A Figura 46 mostra que o estímulo com células da cepa LO4 promoveu uma proliferação significativa dos esplenócitos logo após 6 horas de contato ($P < 0,05$). Este efeito mitogênico foi bastante diferencial quando comparado com a proliferação frente aos estímulos

com a cepa LPF e Patoc1, sendo uma diferença significativa entre as cepas observada logo após 4 horas de estímulo.

Uma vez que as cepas virulentas utilizadas constituem uma mesma espécie genética, sendo ambas *L. interrogans*, e, por conseguinte, compartilham muitas proteínas em comum, e somando-se ao fato de que a cepa LPF e a Patoc1, mesmo possuindo um repertório proteico bem distinto, apresentaram um efeito mitogênico muito parecido e baixo, os prováveis responsáveis pelo estímulo diferencial entre as cepas em estudo são os LPS, que são importantes mitógenos de linfócitos B, induzindo crescimento policlonal independente de antígeno (SHIMAUCHI et al., 1996).

Figura 46- Avaliação do potencial mitogênico de diferentes cepas de *Leptospira* sobre esplenócitos murinos

Camundongos BALB/c foram eutanasiados em CO₂ e seus baços foram assepticamente removidos. Os esplenócitos foram ressuspensos em 1 mL de RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e foram aplicadas 5×10^5 células/poço de uma placa de cultura celular. Os esplenócitos foram tratados com leptospirose inativadas em um M.O.I. de 100 ou foram destituídos de estímulo, sendo este tratamento empregado como controle negativo de proliferação. As células foram incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% CO₂, sendo então o estímulo com as leptospirose adicionado por 2, 4, 8 e 16 horas, representando um total de 40 horas total de cultura celular, em atmosfera umidificada, e a taxa de proliferação celular foi determinada em função da replicação do DNA, medida pela incorporação de bromodesoxiuridina (BrdU). As análises estatísticas foram realizadas dentro de um mesmo grupo, para se avaliar a diferença em diferentes tempos de estímulo (*P<0,05), e entre os grupos em um mesmo tempo (##P<0,01), para se avaliar o diferencial de proliferação por cada cepa de *Leptospira*, por meio do teste estatístico ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

O potencial mitogênico sobre células de baço de camundongos já foi demonstrado para LPS de diferentes micro-organismos, como por exemplo, *Bacteroides fragilis* (JOINER; MCADAM; KASPER, 1982), *Porphyromonas gingivalis* (SHIMAUCHI et al., 1996) e *Salmonella typhimurium* (VON JENEY; GÜNTHER; JANN, 1977). Embora o LPS de

Leptospira spp. seja menos endotóxico que o LPS de *E. coli* (FAINE et al., 1999), Sourek et al. (1991) não encontraram uma boa correlação entre o potencial mitogênico de LPS obtidos de espécies de *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia* e *Shigella* e seu grau de endotoxicação.

Para se avaliar se o potencial mitogênico destas cepas utilizadas se correlacionava a seu potencial inflamatório, diferentes citocinas foram dosadas no sobrenadante de cultura, a qual foi realizada em condições semelhantes às acima citadas, excetuando-se o fato de que foram utilizadas placas de 24 poços, cada qual contendo 5×10^6 células de baço, mantendo-se o M.O.I de 100. As citocinas IL-10, IL-4, IL-12, TNF- α e IFN- γ foram quantificadas por kits comerciais de ELISA sanduíche.

Apenas níveis significativos do fator de necrose tumoral (TNF)- α foram encontrados nos sobrenadantes da cultura celular após estímulo (Figura 47), sobretudo após 6 horas com a cepa hemorrágica LO4, sendo observada diferença significativa em relação ao tratamento sem estímulo ($P < 0,05$) e em relação às outras duas cepas em questão ($P < 0,01$). Interessantemente, os níveis desta citocina inflamatória foram expressivamente menores no estímulo com a cepa saprofítica, Patoc.

Tajiki e Salomao (1996) quantificaram os níveis de TNF- α em pacientes com leptospirose e observaram que esta citocina se correlacionava positivamente ao envolvimento renal, hepático e pulmonar. Este estudo sugeriu que os níveis desta citocina inflamatória poderia ser um marcador de prognóstico ruim durante a doença. Também já foi mostrado que o peptídeoglicano de leptospira induz a liberação de TNF- α por monócitos humanos (CINCO et al., 1996). Os resultados obtidos neste trabalho mostram uma boa correlação entre o potencial mitogênico das cepas testadas e a indução da produção de TNF- α .

Similarmente à sepse, a leptospirose em humanos está associada a altos níveis plasmáticos e séricos de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-8, IL-1 β e IL-12p40 (MATSUI et al., 2011; REIS et al., 2013; WANG et al., 2012). De fato, a produção de citocinas inflamatórias, sobretudo TNF- α , por células T CD4+ após estimulação com antígenos de leptospira é maior em pacientes acometidos pela forma severa da doença (VOLZ et al., 2015).

Zhang et al. (2016) avaliaram o efeito de um agonista de TLR2 durante infecção experimental em hamster e concluíram que o abrandamento dos sintomas nos animais que receberam este tratamento foi correlacionado a um aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 e consequentemente a um aumento da razão IL-10/TNF- α , mais uma vez salientando o efeito nocivo de uma inflamação exacerbada em modelo animal. A produção de IL-10 nos

hamsters que receberam o agonista foi comparável com os níveis encontrados em camundongos resistentes a infecção.

Figura 47- Indução da secreção de TNF- α por esplenócitos murinos em contato com *Leptospira*

A citocina TNF- α foi medida por ELISA sanduíche, no qual o anticorpo de captura foi imobilizado na placa de ELISA durante 16 horas, a placa foi lavada e bloqueada. Os padrões de citocinas foram diluídos para compor uma curva de concentração. Então, 100 μ L de cada sobrenadante foram adicionados a cada poço, e a placa foi incubada por 2 horas a 37 °C. Foi adicionado o anticorpo de detecção (1:2.000), seguido por 2 horas de incubação; o substrato foi adicionado a cada poço e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. As leituras colorimétricas foram feitas no comprimento de onda de 405 nm, e os valores de absorbância foram convertidos em valores de concentração mediante comparação com a curva de concentrações gerada. As análises estatísticas foram realizadas dentro de um mesmo grupo, para se avaliar a diferença em diferentes tempos de estímulo (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$), e entre os grupos em um mesmo tempo (# $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$), para se avaliar o diferencial de proliferação ou liberação de citocinas induzido por cada cepa de *Leptospira*, por meio do teste estatístico ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

Uma inflamação aguda, em resposta a uma infecção severa ou trauma, resulta em uma ativação sistêmica da cascata de coagulação (ESMON et al., 1999; LEVI et al., 1999) e as citocinas inflamatórias desempenham um papel fundamental nesta ativação. A citocina TNF- α é capaz de ativar a coagulação via fator tissular (FT) em indivíduos saudáveis (BAUER et al., 1989; VAN DER POLL et al., 1990).

4.20.2 Imunização prévia por bacterina heteróloga reduz a sobrevivência após infecção

Resultados anteriores de desafio do nosso grupo têm mostrado que não existe uma proteção cruzada quando se emprega bacterinas heterólogas à cepa infectante (dados não publicados). Por exemplo, não são observados sobreviventes quando animais são imunizados

com bacterinas preparadas a partir de células de *L. interrogans* sorovar Kennewicki e então infectados com doses letais de *L. interrogans* sorovar Canicola, mesmo que estas sejam de mesma espécie genética. Isto nos antecipa que a proteção contra a leptospirose é bastante dependente da resposta imune contra os LPS.

Partindo destas observações, foi investigado qual seria o efeito de uma imunização com uma cepa heteróloga na sobrevivência dos animais após desafio subletal, ou seja, utilizando uma concentração de leptospiros próxima a DL 50. Para tal, os animais foram imunizados pela via subcutânea duas vezes, em intervalos de 2 semanas, com bacterina preparada a partir de células de *L. interrogans* sorovar Kennewicki, *L. interrogans* sorovar Canicola ou solução salina, e então desafiados intraperitonealmente com *L. interrogans* sorovar Canicola.

Conforme apresentado na Figura 48, todos os animais imunizados com a bacterina homóloga sobreviveram, o que é esperado, sendo que os animais que receberam apenas solução salina apresentaram 50% de sobrevivência, em virtude do modelo de infecção subletal. Interessantemente, os animais imunizados com a bacterina heteróloga tiveram um agravamento dos sintomas e consequentemente aumento de mortalidade, não sendo observados sobreviventes.

Figura 48- Efeito da imunização com bacterina heteróloga na sobrevivência de hamsters desafiados

Hamsters machos (n=6) foram imunizados duas vezes, pela via subcutânea, com bacterinas produzidas a partir das cepas de *L. interrogans* sorovares Pomona Fromm (LPF) e Canicola (LO4), totalizando a quantidade de 10^9 leptospiros por animal, em intervalos de 2 semanas. Como controle, foi empregado um grupo de animais injetados com solução salina. Transcorridas mais duas semanas após a última imunização, os animais foram inoculados intraperitonealmente com uma dose sub-letal de leptospiros, definida por experimentos de curva de sobrevivência. Os animais foram monitorados por 21 dias e eutanasiados à medida que exibissem sinais de leptospirose fulminante, como perda de peso, prostração e sangramento no trato urinário.

Estes resultados indicam que a inflamação previa causada pela imunização com células de leptospira e a ausência de anticorpos protetores tem um efeito deletério nestes animais. Os animais imunizados com a bacterina homóloga, embora seja esperado que tenham inflamado também, sobrevivem, pois montam uma resposta imune adequada, isto é, anticorpos anti-LPS que são capazes de neutralizar as leptospiras e impedir a colonização renal (LEVETT, 2001).

Estes resultados podem explicar alguns resultados prévios obtidos em nosso laboratório nos quais imunização com algumas proteínas recombinantes de *Leptospira* induzia mais mortalidade do que a observada nos controles injetados apenas com solução salina.

Xia et al. (2017) realizaram um experimento no qual camundongos *wild type* e deficientes para TLR4 foram infectados com uma cepa virulenta de *Leptospira* capaz de causar sintomas de infecção aguda neste modelo animal, normalmente assintomático. Os autores notaram que os animais *wild type*, mesmo possuindo um menor número de bactérias no sangue e nos órgãos, possuíam níveis muito superiores de citocinas inflamatórias, em contraste com os animais deficientes para TLR4 que, mesmo possuindo mais bactérias no sangue e nos órgãos, inflamaram menos e, por conseguinte, apresentaram menos manifestações hemorrágicas. Os autores concluem que as manifestações hemorrágicas dependem muito mais da resposta imune do hospedeiro do que da carga bacteriana, fortalecendo nossa tese do efeito indireto das leptospiras.

4.20.3 Efeito da utilização de anti-inflamatório sobre a sobrevivência e sintomatologia de hamsters infectados

Nossos resultados, em conjunto com dados da literatura, apontam uma ativação da coagulação em indivíduos acometidos pela leptospirose, com uma consequente redução dos níveis séricos de fatores e inibidores da coagulação. Ao que tudo indica, essa ativação se dá principalmente por conta de um mecanismo indireto, sendo as citocinas inflamatórias o principal candidato na investigação dos distúrbios coagulatórios que ocorrem durante os casos mais severos da doença, por induzirem a ativação da coagulação.

Assim sendo, investigou-se diretamente o papel da inflamação sobre o curso da doença em modelo animal, bem como a associação da gravidade dos quadros hemorrágicos à presença da inflamação. Para tal, foi utilizado o anti-inflamatório corticoide dexametasona e desafio com a cepa hemorrágica *L. interrogans* sorovar Canicola cepa LO4.

O mecanismo fundamental de atuação dos glicocorticoides é sobre a transcrição gênica, uma vez que a molécula livre, por ser lipofílica, atravessa por difusão passiva a membrana celular da célula-alvo se ligando a receptores proteicos específicos no citoplasma da mesma. O complexo glicocorticoide-receptor sofre transformação estrutural e se torna capaz de penetrar no núcleo celular, no qual se liga a regiões promotoras de certos genes, denominadas elementos responsivos aos glicocorticoides, induzindo a síntese de proteínas anti-inflamatórias, como a lipocortina-1 e I κ B α (do inglês *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*) (SCHEINMAN et al., 1995).

Ao induzir um aumento da síntese de I κ B α , a ação do fator nuclear kappa B é inibida, tanto por bloqueio de seu peptídeo sinal de localização nuclear quanto de sua capacidade de se ligar à molécula de DNA (JACOBS; HARRISON, 1998; VERMA et al., 1995). Com o bloqueio da ação do fator nuclear, a síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-2 é reduzida.

Primeiramente, foi avaliado o efeito de diferentes tempos de início da aplicação do anti-inflamatório sobre a sobrevivência dos animais e manifestações hemorrágicas (presença de focos hemorrágicos no pulmão e de sangue no trato urinário). Conforme mostra a Figura 49, os animais que receberam apenas solução salina (PBS) começaram a vir a óbito no dia 9, estando todos mortos ao final do dia 10. A administração um dia antes do desafio (Dexametasona -1) acarretou em um efeito deletério aos animais, antecipando em 1 dia a mortalidade dos mesmo, uma vez que não houve sobreviventes após o dia 9.

Já quando o anti-inflamatório foi administrado logo após a infecção experimental (Dexametasona) ou 4 dias após a mesma (PBS+Dexametasona), observou-se um efeito de aumento do tempo de sobrevivência, sendo observado um deslocamento da curva para a direita, sobretudo quando administrado após 4 dias, sendo detectada diferença significativa em relação ao grupo que recebeu apenas solução salina ($P < 0,01$).

Figura 49- Efeito da administração de dexametasona no tempo de sobrevivência dos animais

Hamsters machos receberam uma dose de 1,25 mg/kg de anti-inflamatório dexametasona pela via intraperitoneal diariamente começando um dia antes do desafio (Dexametasona-1), imediatamente após o desafio (Dexametasona) ou quatro dias após o desafio (PBS+Dexametasona), sendo que um grupo recebeu apenas solução salina (PBS). Os animais foram desafiados com a cepa virulenta e hemorrágica *L. interrogans* sorovar Canicola LO4 e acompanhados quanto à evolução dos sintomas.

De maneira geral, a administração do anti-inflamatório acarretou em uma atenuação das manifestações hemorrágicas nos animais. Mesmo quando o corticoide foi administrado antes da infecção, antecipando a mortalidade dos animais, estes apresentaram menos sangramento pelo trato urinário e uma melhoria macroscópica nos pulmões quando comparado aos animais que receberam apenas solução salina. Imagens representativas dos pulmões estão apresentadas na Figura 50 e um resumo dos sintomas apresentados está mostrado na Tabela 2.

Figura 50- Manifestações hemorrágicas em pulmões de hamsters infectados

Amostras representativas de pulmões de hamsters desafiados com a cepa virulenta *L. interrogans* sorovar Canicola LO4. A atribuição da gravidade dos sintomas foi baseada na extensão e frequência dos focos hemorrágicos (pontos escuros).

Tabela 2- Avaliação macroscópica em animais infectados com *L. interrogans* sorovar Canicola cepa LO4

Grupo	Hemorragia Pulmonar	Sangue na urina
PBS		
Animal 1	+++	+
Animal 2	++	+
Animal 3	+++	+
Animal 4	+++	+
Animal 5	+	+
Animal 6	++	+
Dexametasona -1		
Animal 1	+	-
Animal 2	-	-
Animal 3	+	-
Animal 4	-	-
Animal 5	+++	+
Animal 6	++	+
Dexametasona		
Animal 1	+	-
Animal 2	-	-
Animal 3	+	-
Animal 4	+	+
Animal 5	+	+
Animal 6	+	-
PBS+Dexametasona		
Animal 1	-	-
Animal 2	+	-
Animal 3	+	-
Animal 4	++	-
Animal 5	+	+
Animal 6	++	-

A hemorragia pulmonar foi classificada de acordo com a frequência de focos hemorrágicos (-, ausente; +, leve; ++, moderado; +++, severa). Os animais também foram avaliados quanto a presença (+) ou ausência (-) de sangue no trato urinário.

O fenômeno de os animais que receberam o anti-inflamatório desde um dia antes da infecção pelas leptospiros (Dexametasona -1) morrerem mais cedo em comparação ao grupo que não recebeu o anti-inflamatório pode ser explicado pelo fato de que estes, por conta da inflamação limitada no momento da infecção inicial, não foram capazes de montar uma resposta imune inata adequada contra as bactérias, podendo este fato levar a um aumento da carga bacteriana em diferentes órgãos. Sabidamente, uma rápida e controlada resposta

inflamatória no início da infecção é um dos diferenciais entre os modelos animais resistentes e suscetíveis, os quais apresentam uma resposta imune inflamatória mais tardia e exacerbada (MATSUI et al., 2011). De fato, experimentos em camundongos deficientes para receptor de TNF- α sugerem que a inflamação inicial é importante para o controle da infecção (ATHANAZIO et al., 2008).

O efeito deletério da inflamação durante a leptospirose também foi estudado por Zhang et al. (2017); os autores concluíram que a administração de anti-inflamatório em camundongos aliviava os sintomas de inflamação uterina e dano tecidual, estando de acordo com a menor concentração de citocinas inflamatórias.

4.20.4 Detecção de protrombina e de inibidores de trombina no soro de animais tratados com anti-inflamatório

Uma vez que foi observada uma atenuação macroscópica dos sintomas hemorrágicos após a administração do anti-inflamatório, os níveis de protrombina e inibidores de trombina no soro dos animais infectados, em diferentes tempos, foram avaliados, conforme metodologias já descritas anteriormente neste trabalho.

Pôde-se notar que os animais que receberam o anti-inflamatório apresentaram uma melhor manutenção dos níveis de inibidores de trombina, o que sugere uma menor ativação da coagulação; mesmo que o grupo que recebeu o anti-inflamatório antes da infecção (Dexametasona -1) tenha morrido antes, os animais apresentaram menos sinais hemorrágicos, o que está correlacionado com a melhor manutenção dos níveis de inibidores de trombina ($P < 0,05$).

Cabe ressaltar que o grupo que recebeu o anti-inflamatório após o quarto dia de infecção não apresentou redução dos níveis de inibição de trombina, sendo, portanto estatisticamente diferente do grupo controle que não recebeu anti-inflamatório ($P < 0,01$) e, por conseguinte, apresentaram maior sobrevida e menos sintomas de hemorragia, fortalecendo nossa tese de que as manifestações hemorrágicas nos casos severos de leptospirose estão relacionadas, dentre outras variáveis, à inflamação exacerbada contra a bactéria que gera uma ativação da coagulação acarretando no consumo de inibidores de trombina, sobretudo a antitrombina.

Figura 51- Dexametasona evita a redução exacerbada dos níveis de inibidores de trombina após infecção com leptospiros

Hamsters machos receberam uma dose de 1,25 mg/kg de anti-inflamatório dexametasona pela via intraperitoneal diariamente começando um dia antes do desafio (Dexametasona-1), imediatamente após o desafio (Dexametasona) ou quatro dias após o desafio (PBS+Dexametasona), sendo que um grupo recebeu apenas solução salina (PBS). Os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital em diferentes dias e os níveis de inibidores de trombina foram determinados nas amostras de soro. As comparações estatísticas foram feitas por meio do teste estatístico ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, levando em consideração os valores obtidos no D9 (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). Os asteriscos sobre as barras se referem à comparação com o grupo PBS.

Em seguida, foi verificado se a melhor manutenção dos níveis de inibidores de trombina após a infecção nos animais que receberam anti-inflamatório seria acompanhada também pela manutenção dos níveis de protrombina. Conforme apresentado na Figura 52, todos os grupos que receberam dexametasona apresentaram uma melhor manutenção dos níveis de protrombina no dia 9, em comparação com o grupo que recebeu apenas solução salina no curso da infecção, indicando menor ativação da coagulação e consequente consumo de protrombina.

Elg e Gustafsson (2006), ao avaliarem o efeito da dexametasona em modelo de endotoxemia experimental em ratos, observaram que a administração do anti-inflamatório nos animais os protegeu das consequências da ativação da coagulação, sendo que estes apresentaram um menor consumo de fibrinogênio e plaquetas; ademais, a combinação de dexametasona com melagatran, um inibidor de trombina, evitou a deposição de fibrina no fígado e baços dos animais.

Similarmente, Frauenfelder et al. (1982) mostraram que, durante choque endotóxico, pôneis apresentavam tempos de trombina, tromboplastina parcial ativada e protrombina aumentados, o que evidencia consumo de fatores de coagulação. O tratamento com

dexametasona preveniu a elevação dos parâmetros citados, indicando que a inflamação durante endotoxemia provocou uma ativação da coagulação nestes animais.

Figura 52- Efeito do anti-inflamatório sobre os níveis de protrombina após infecção

Hamsters machos receberam uma dose de 1,25 mg/kg de anti-inflamatório dexametasona pela via intraperitoneal diariamente começando um dia antes do desafio (Dexametasona-1), imediatamente após o desafio (Dexametasona) ou quatro dias após o desafio (PBS+Dexametasona), sendo que um grupo recebeu apenas solução salina (PBS). Os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital em diferentes dias e os níveis de protrombina foram determinados nas amostras de soro por meio da adição de FXa e substrato cromogênico para trombina. As comparações estatísticas foram feitas por meio do teste estatístico ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, levando em consideração os valores obtidos no D9 (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). Os asteriscos sobre as barras se referem à comparação com o grupo PBS.

4.20.5 Detecção de Fator Tissular em amostras de soro de hamsters infectados

O FT é uma molécula expressa constitutivamente em um vasto número de células (MANN et al., 1998), as quais se localizam em tecidos que não estão em contato direto com o sangue, principalmente em tecidos subendoteliais. Quando em contato com o sangue, o FT interage com o FVII, iniciando a via extrínseca da coagulação, culminando na formação de trombina. A expressão de FT por células endoteliais, macrófagos e monócitos é induzida, dentre vários componentes, por citocinas inflamatórias (LEVI; DE JONGE; VAN DER POLL, 2003).

Quando células mononucleares humanas foram estimuladas *in vitro* por cepas virulentas e avirulentas de *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae, uma diferença na atividade coagulatória foi observada, sendo esta mais proeminente após estímulo com a cepa

virulenta (MIRAGLIOTTA; FUMAROLA, 1983). Este efeito não foi observado quando plasma deficiente para FVII foi usado, sugerindo um mecanismo dependente de FT.

Os soros dos animais infectados com a cepa hemorrágica de *L. interrogans* sorovar Canicola cepa LO4, que receberam ou não o anti-inflamatório, foram analisados quanto às concentrações de FT. Para tal, foi empregado um kit de ELISA sanduíche, com anticorpos anti-FT pré-imobilizados para captura do antígeno.

Todos os animais infectados apresentaram um aumento das concentrações séricas de FT no curso da infecção, quando se compara as concentrações no dia 9 e no dia 0 (Figura 53A); entretanto, não foi observada diferença significativa, provavelmente por conta do uso de duplicata, o que reduz o poder estatístico. Nota-se uma tendência a um menor aumento das concentrações de FT no soro dos animais que receberam o anti-inflamatório (Figura 53B), uma vez que os animais que não receberam este tratamento mostraram um aumento de 45% na concentração de FT, contrastando-se com 23 e 20% nos animais que começaram a receber o anti-inflamatório no dia 0 ou dia 4, respectivamente. Este resultado está de acordo com nossa hipótese que a inflamação do hospedeiro contra as leptospiros ocasiona uma ativação da coagulação, a qual é iniciada pelo aumento da expressão de FT.

Figura 53- A infecção por *Leptospira* spp. induz um aumento de FT em soro de hamsters

Hamsters machos receberam uma dose de 1,25 mg/kg de anti-inflamatório dexametasona pela via intraperitoneal diariamente começando imediatamente após o desafio (Dexametasona) ou quatro dias após o desafio (PBS+Dexametasona), sendo que um grupo recebeu apenas solução salina (PBS). Foram adicionados 50 µL dos soros de interesse por poço de uma placa de ELISA, na qual previamente anticorpos de captura anti-FT haviam sido imobilizados. Imediatamente, foram adicionados 100 µL da solução de anticorpos de detecção conjugado com peroxidase, incubados por 1 hora a 37 °C. A placa foi lavada e 100 µL da solução de substrato foram adicionados, sendo a revelação mantida por 15 minutos, parada com 50 µL de H₂SO₄ 2M e as soluções lidas no comprimento de onda de 420 nm. Foi feita uma curva padrão do componente para cálculo das concentrações nas amostras. O experimento foi realizado em duplicata, sendo apresentado um experimento independente.

Embora a forma predominante do FT seja associada à membrana de células, sua forma solúvel é encontrada em soro e plasma de humanos saudáveis e é aumentada durante uma coagulação ativada (KOYAMA et al., 1994); é provável que o FT encontrado no soro seja resultante da clivagem por metaloproteases produzidas durante um estado inflamatório (LEVI; DE JONGE; VAN DER POLL, 2003), ou esteja presente em microvesículas. Em confluência a estes dados, Viera et al. (2016) encontraram níveis aumentados de FT tanto em microvesículas quanto em soro de pacientes acometidos por leptospirose.

Szotowski et al. (2005) verificaram que células endoteliais, quando em contato com citocinas inflamatórias, sobretudo TNF- α e IL-6, liberam a forma solúvel do FT, o qual possui atividade pró-coagulante na presença de fosfolipídeos; sobremaneira, os autores sugerem que o aumento da concentração da forma solúvel do FT pode ser considerado um marcador de desbaço homeostático.

Além de níveis aumentados de FT durante a infecção, níveis reduzidos de seus inibidores, especialmente TFPI, poderiam agravar o quadro de coagulação ativada. Sabidamente, metaloproteases de matriz (MMP, do inglês *matrix metalloprotease*), incluindo MMP-9, são capazes de degradar TFPI (BELAAOUAJ et al., 2000). Os níveis aumentados de metaloproteases de matriz (MMP), especialmente MMP-9 (VIERA et al., 2013), durante a leptospirose poderiam, portanto, favorecer a ativação da coagulação.

Vários componentes das leptospirosas, como LPS (WERTS et al., 2001), peptidioglicanos (CINCO et al., 1996), glicoproteínas (DIAMENT et al., 2002), lipoproteínas e proteínas transmembrana (YANG et al., 2006a), estão envolvidos na indução da resposta imune inflamatória do hospedeiro e consequente secreção de citocinas inflamatórias. Estes componentes podem ser reconhecidos na fase de disseminação das bactérias na corrente sanguínea, leptospiremia, na qual células imunes do hospedeiro reconhecem os componentes expostos na superfície das bactérias, as quais também podem sofrer lise celular por conta da resposta imune inata do hospedeiro, liberando, portanto, outros componentes com potencial inflamatório.

Após as leptospirosas estarem albergadas nos túbulos renais, fase esta chamada de leptospirúria, podem continuamente induzir inflamação nas células renais, favorecendo um estado pró-inflamatório constante no hospedeiro e consequentemente, um estado pró-coagulatório. De fato, já foi mostrado que a proteína majoritária de leptospirosas patogênicas, LipL32, induz resposta inflamatória via TLR2 em células renais humanas (LO et al., 2013).

Estes resultados estão de acordo com os dados que apontam uma forte correlação entre as formas mais severas da leptospirose e a concentração de $\text{TNF-}\alpha$ e outras citocinas inflamatórias (REIS et al., 2013), as quais induzem a expressão de FT, o que provavelmente também acontece em superfícies celulares (MIRAGLIOTTA et al., 1982). Este componente induz a iniciação da coagulação pela via extrínseca, dependente de FVII, culminando numa geração desenfreada de trombina, e consequentemente ao esgotamento dos fatores e inibidores de coagulação e formação de trombos, que podem levar à falência múltipla de órgãos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A formação do coágulo de fibrina em sítios de injúria vascular pode, além de impedir a perda excessiva de sangue, evitar a disseminação de patógenos para locais secundários de infecção. Assim sendo, uma menor formação do coágulo favoreceria a disseminação das leptospiras, as quais poderiam exercer um efeito direto ou indireto no via de coagulação, sendo este último normalmente uma consequência de um processo inflamatório exacerbado.

Dentre as várias reações de proteólise que ocorrem no curso da via coagulatória, o presente trabalho se iniciou explorando os efeitos diretos das leptospiras nas reações da via comum, na qual a protrombina é convertida em sua forma ativa, a trombina, a qual age sobre o fibrinogênio solúvel do plasma, convertendo-o a uma rede insolúvel de fibrina. Foi mostrado que diferentes cepas de *Leptospira* são pouco eficientes em se ligar a protrombina humana e, consequentemente, não impedem sua ativação à trombina.

Já no que tange à trombina, foi mostrado que leptospiras virulentas são extremamente eficientes em se ligar ao componente via receptores de superfície e o sítio de reconhecimento de substratos da enzima, cunhado exosítio I, responsável pelo reconhecimento de fibrinogênio e outros zimógenos importantes para as reações de *feedback* positivo de síntese de trombina. O sequestro do exosítio I pelas leptospiras virulentas levou a uma redução drástica na atividade da enzima, evidenciado pela menor formação do coágulo de fibrina. Menores concentrações de trombina também são responsáveis pela formação de coágulos mais frágeis, favorecendo ainda mais a disseminação das bactérias.

Em adição, foi verificada uma atividade proteolítica de leptospiras virulentas sobre a molécula de trombina, na presença de íons cálcio, o que impactou ainda mais na redução da sua atividade. O fato de apenas as cepas virulentas serem eficientes em bloquear e degradar a trombina sugere que este é um mecanismo relevante para que as bactérias consigam promover a infecção. O fato das concentrações da enzima serem extremamente baixas durante as etapas iniciais da coagulação faz com que ela seja um alvo mais efetivo para bloqueio/degradação.

Várias proteínas recombinantes foram ensaiadas quanto sua capacidade de interação com a trombina, incluindo duas proteínas de *Leptospira* com homologia a um ligante de trombina já descrito e, embora algumas proteínas tenham mostrado ligação significativa com a enzima, apenas a proteína Lsa23 foi capaz de reduzir significativamente, mesmo que pouco,

a sua atividade. A expressão heteróloga da proteína Lsa23 na cepa saprofítica *L. biflexa* não conferiu a esta maior ligação à trombina, provavelmente em virtude do baixo número de cópias da proteína.

Abaixo, segue um esquema simplificado dos resultados de efeito direto das leptospiros sobre as moléculas em estudo (Figura 54).

Figura 54- Representação esquemática dos efeitos diretos das leptospiros no sistema de coagulação

Quando ocorre dano endotelial, há exposição do Fator Tissular (FT) ao sangue, o qual inicia a via extrínseca da coagulação, culminando na ativação da protrombina à trombina, a qual cliva o fibrinogênio em fibrina, formando um coágulo no local da injúria vascular, estancando o sangramento. Quando as leptospiros estão na corrente sanguínea, são capazes de capturar a trombina via exosítio I (ESI) e degradá-la na presença de íons cálcio (visão mais detalhada no quadro em destaque), via receptores de superfície ainda não descritos. A ligação das leptospiros à trombina acarreta em uma menor atividade da enzima, e conseqüentemente menor formação do coágulo, favorecendo a disseminação das bactérias para outros tecidos.

Foi verificado que soros de pacientes acometidos pela leptospirose apresentam níveis reduzidos de antitrombina e protrombina, com uma forte correlação entre estes dois parâmetros, sugerindo uma ativação da coagulação, a qual é corroborada pela presença aumentada de F1+2 nestas amostras de soro, sendo este um produto da ativação *in vivo* da protrombina. O aumento das concentrações de PAI-1, um inibidor do ativador de plasminogênio, no soro de pacientes na fase convalescente da doença mais uma vez aponta que exista uma ativação da coagulação.

A validação destes achados em modelo animal mostrou que a mortalidade dos animais e a presença de focos hemorrágicos estão relacionados à redução sérica de inibidores de trombina e protrombina.

A incapacidade das leptospiros em interagir/degradar protrombina e antitrombina sugere um mecanismo indireto de ação das bactérias. Existe uma relação direta entre

inflamação e coagulação: citocinas inflamatórias desempenham um papel chave na ativação da coagulação, ocasionando um aumento de expressão de Fator Tissular, o principal iniciador *in vivo* da coagulação.

A cepa virulenta *L. interrogans* sorovar Canicola cepa LO4, que induz intensa hemorragia nos animais infectados, induziu maior liberação de TNF- α em culturas de esplênócitos murinos em relação à cepa menos hemorrágica de *Leptospira*. O papel da inflamação na sintomatologia hemorrágica dos animais foi validado pela administração de anti-inflamatório, em diferentes esquemas, nos animais infectados com a cepa hemorrágica. Em geral, os animais que receberam anti-inflamatório apresentaram um maior tempo de sobrevivência e um melhor controle dos níveis de protrombina e inibidores de trombina no soro.

A detecção de Fator Tissular nas amostras de soro mostra uma tendência à elevação das concentrações séricas no curso da infecção, com uma melhor manutenção nos animais que receberam anti-inflamatório, corroborando a tese de que a inflamação exacerbada contra as leptospiros induz uma ativação da coagulação. Um esquema simplificado ilustra o efeito indireto das leptospiros no sistema de coagulação (Figura 55).

Figura 55- Representação esquemática dos efeitos indiretos das leptospiros no sistema de coagulação

Quando as leptospiros estão na corrente sanguínea, inicia-se o reconhecimento de seus componentes por células imunes circulantes e células endoteliais, as quais secretam citocinas inflamatórias. Neste momento, níveis normais de protrombina (PT) e antitrombina (AT) são encontrados no plasma. As citocinas inflamatórias, sobretudo TNF- α , induzem a síntese de Fator Tissular (FT) nas células endoteliais, macrófagos e a forma solúvel do mesmo. FT inicia a coagulação de maneira sistêmica, gerando uma produção exacerbada de trombina, com consequente consumo de PT (elevação de F1+2, fragmento de ativação da PT) e AT, culminando em um esgotamento dos fatores de coagulação. Mesmo quando as leptospiros não estão mais na corrente sanguínea, continuamente induzem inflamação em células renais, gerando uma constante ativação da coagulação. Quando ocorre dano endotelial, não existem fatores de coagulação suficientes para formação do coágulo, ocorrendo sangramento.

Em suma, durante a fase de disseminação das bactérias na corrente sanguínea, conhecida como leptospiremia, as leptospiras sequestram a trombina via sítio de reconhecimento de substrato, ocasionando uma menor formação de coágulo de fibrina e favorecendo a disseminação para outros tecidos. Durante esta fase, componentes da bactéria começam a ser reconhecidos pelo sistema imune, gerando inflamação; quando as leptospiras se alojam nos rins do hospedeiro, continuamente induzem a inflamação nas células renais. A elevação das citocinas inflamatórias, sobremaneira $\text{TNF-}\alpha$, induz a expressão de Fator Tissular de maneira disseminada, o qual inicia a coagulação, gerando um esgotamento de fatores e inibidores de coagulação e também formação de trombos, que podem ocasionar falência de órgãos. Quando ocorre dano endotelial, em virtude de algum componente secretado da bactéria ou da inflamação em si, não há componentes suficientes para formação do coágulo, ocorrendo intenso sangramento.

6 CONCLUSÕES

A interação de cepas virulentas de *Leptospira* com a molécula de trombina ocorre via exosítio I, região da enima responsável pelo reconhecimento da maioria de seus substratos. Esta interação gera uma menor disponibilidade local de trombina, ocasionando menor formação do coágulo de fibrina, o qual também se torna mais frouxo e mais suscetível à degradação. Aparentemente, este mecanismo está mais relacionado à disseminação inicial das bactérias para outros tecidos do que às manifestações hemorrágicas durante a leptospirose.

Os resultados obtidos durante este trabalho apontam fortemente que às manifestações hemorrágicas severas são devidas a um efeito indireto das bactérias. A resposta imune montada pelo hospedeiro contra vários componentes das leptospirosas gera uma resposta inflamatória desenfreada, capaz de estimular a síntese *de novo* de Fator Tissular, o principal iniciador *in vivo* da coagulação. Assim, ocorre uma coagulação ativada, culminando no esgotamento de fatores de coagulação e formação de trombos intravasculares, podendo levar à hemorragia e falência de órgãos.

O melhor entendimento dos mecanismos subjacentes às manifestações hemorrágicas durante a leptospirose severa pode auxiliar no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS¹

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet Microbiol**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- ADLER, B. et al. Maturation of humoral immune response determines the susceptibility of guinea-pigs to leptospirosis. **Pathology**, v. 12, n. 4, p. 529-538, 1980.
- AGAMPODI, S. B. et al. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 9, p. 1249-1255, 2012.
- AIRD, W. C. Coagulation. **Crit Care Med**, v. 33, n. 12 Suppl, p. S485-487, 2005.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANDRE-FONTAINE, G.; AVIAT, F.; THORIN, C. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water. **Curr Microbiol**, v. 71, n. 1, p. 136-142, 2015.
- ARITA, Y. et al. [A Case of Leptospirosis in which the Causative Pathogen was Detected Using Cerebrospinal Fluid PCR Eight Days after Onset]. **Kansenshogaku Zasshi**, v. 90, n. 3, p. 325-329, 2016.
- ATHANAZIO, D. A. et al. Experimental infection in tumor necrosis factor alpha receptor, interferon gamma and interleukin 4 deficient mice by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Trop**, v. 105, n. 1, p. 95-98, 2008.
- ATZINGEN, M. V. et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol**, v. 8, n. p. 70, 2008.
- BALLARD, S. A. et al. Interactions of virulent and avirulent leptospires with primary cultures of renal epithelial cells. **J Med Microbiol**, v. 21, n. 1, p. 59-67, 1986.
- BARBOSA, A. S. et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infect Immun**, v. 74, n. 11, p. 6356-6364, 2006.
- BARBOSA, A. S. et al. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infect Immun**, v. 77, n. 3, p. 1137-1143, 2009.
- BARRAGAN, V. A. et al. Interactions of leptospira with environmental bacteria from surface water. **Curr Microbiol**, v. 62, n. 6, p. 1802-1806, 2011.
- BAUER, K. A. et al. Tumor necrosis factor infusions have a procoagulant effect on the hemostatic mechanism of humans. **Blood**, v. 74, n. 1, p. 165-172, 1989.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BELAAOUAJ, A.A. et al. Matrix metalloproteinases cleave tissue factor pathway inhibitor: Effects on coagulation. **J Biol Chem**, v. 275, p. 27123–27128, 2000.

BENSCHOP, J. et al. Sero-prevalence of leptospirosis in workers at a New Zealand slaughterhouse. **N Z Med J**, v. 122, n. 1307, p. 39-47, 2009.

BEZERRA, J. A. et al. Plasminogen deficiency leads to impaired remodeling after a toxic injury to the liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 26, p. 15143-15148, 1999.

BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BIEMOND, B. J. et al. Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor I release during experimental endotoxaemia in chimpanzees: effect of interventions in the cytokine and coagulation cascades. **Clin Sci (Lond)**, v. 88, n. 5, p. 587-594, 1995.

BINDER, B. R. et al. Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. **News Physiol Sci**, v. 17, n. p. 56-61, 2002.

BODE, W.; TURK, D.; KARSHIKOV, A. The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. **Protein Sci**, v. 1, n. 4, p. 426-471, 1992.

BOON HINCKLEY, M. et al. A *Leptospira interrogans* enzyme with similarity to yeast Ste14p that methylates the 1-phosphate group of lipid A. **J Biol Chem**, v. 280, n. 34, p. 30214-30224, 2005.

BRENNER, D. J. et al. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **Int J Syst Bacteriol**, v. 49 Pt 2, n. p. 839-858, 1999.

BROWN, P. D. et al. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. **Res Microbiol**, v. 154, n. 8, p. 581-586, 2003.

BRUCE, M. G. et al. Leptospirosis among patients presenting with dengue-like illness in Puerto Rico. **Acta Trop**, v. 96, n. 1, p. 36-46, 2005.

BULACH, D. M. et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 39, p. 14560-14565, 2006.

BUTENAS, S.; VAN'T VEER, C.; MANN, K. G. "Normal" thrombin generation. **Blood**, v. 94, n. 7, p. 2169-2178, 1999.

CHALAYON, P. et al. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 5, p. 289-297, 2011.

CHAPPEL, R. J. et al. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 12, p. 5484-5488, 2004.

CHARON, N. W.; GOLDSTEIN, S. F. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. **Annu Rev Genet**, v. 36, n. p. 47-73, 2002.

CHEE, Y. L. Coagulation. **J R Coll Physicians Edinb**, v. 44, n. 1, p. 42-45, 2014.

CHIERAKUL, W. et al. Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 2, p. 254-260, 2008.

CINCO, M. et al. *Leptospira interrogans* and *Leptospira* peptidoglycans induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes. **FEMS Microbiol Lett**, v. 138, n. 2-3, p. 211-214, 1996.

CLAUSEN, T. et al. HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 3, p. 152-162, 2011.

COLLET, J. P. et al. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 5, p. 1354-1361, 2000.

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 9, p. e0003898, 2015.

CRUMP, J. A. et al. Etiology of severe non-malaria febrile illness in Northern Tanzania: a prospective cohort study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2324, 2013.

DA SILVA, J. J. et al. The hemorrhagic syndrome of leptospirosis: an experimental study in guinea pigs. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 28, n. 3, p. 169-177, 1995.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, n. 3638, p. 1310-1312, 1964.

DE LA PEÑA-MOCTEZUMA, A. et al. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. **FEMS Microbiol Lett**, v. 177, n. 2, p. 319-326, 1999.

DEMARRE, G. et al. A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPalpha) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. **Res Microbiol**, v. 156, n. 2, p. 245-255, 2005.

DENIPITIYA, D. T. et al. Application of a real time Polymerase Chain Reaction (PCR) assay for the early diagnosis of human leptospirosis in Sri Lanka. **Biologicals**, v. n. p. 2016.

DESAI, S. et al. Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. **Clin Infect Dis**, v. 48, n. 6, p. 691-697, 2009.

DI NISIO, M.; MIDDELDORP, S.; BÜLLER, H. R. Direct thrombin inhibitors. **N Engl J Med**, v. 353, n. 10, p. 1028-1040, 2005.

DIAMENT, D. et al. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. **Infect Immun**, v. 70, n. 4, p. 1677-1683, 2002.

DONG, H. et al. Characterization of the ompL1 gene of pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. **BMC Microbiol**, v. 8, n. p. 223, 2008.

DOOLITTLE, R. F. Fibrinogen and fibrin. **Annu Rev Biochem**, v. 53, n. p. 195-229, 1984.

ELG, M.; GUSTAFSSON, D. A combination of a thrombin inhibitor and dexamethasone prevents the development of experimental disseminated intravascular coagulation in rats. **Thromb Res**, v. 117, n. 4, p. 429-437, 2006.

ELLINGHAUSEN, H. C.; MCCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: a serum-free medium employing oleic albumin complex. **Am J Vet Res**, v. 26, n. p. 39-44, 1965.

EMEIS, J. J.; KOOISTRA, T. Interleukin 1 and lipopolysaccharide induce an inhibitor of tissue-type plasminogen activator in vivo and in cultured endothelial cells. **J Exp Med**, v. 163, n. 5, p. 1260-1266, 1986.

ESHGHI, A. et al. *Leptospira interrogans* catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence. **Infect Immun**, v. 80, n. 11, p. 3892-3899, 2012.

ESMON, C. T. et al. Inflammation, sepsis, and coagulation. **Haematologica**, v. 84, n. 3, p. 254-259, 1999.

EVANGELISTA, K. et al. *Leptospira interrogans* binds to cadherins. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 1, p. e2672, 2014a.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiol**, v. 5, n. 9, p. 1413-1425, 2010.

EVANGELISTA, K. V. et al. Identification of cell-binding adhesins of *Leptospira interrogans*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 10, p. e3215, 2014b.

FAINE, S. et al. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne: Australia MediSci. 1999. 272 p.

FERNANDES, L. G. et al. *Leptospira* spp.: Novel insights into host-pathogen interactions. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 176, n. p. 50-57, 2016.

FERREIRA, A. S. et al. Direct detection and differentiation of pathogenic *Leptospira* species using a multi-gene targeted real time PCR approach. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112312, 2014.

FINN, R. D. et al. Pfam: clans, web tools and services. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. Database issue, p. D247-251, 2006.

FLANNERY, B. et al. Referral pattern of leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 5, p. 657-663, 2001.

FONTANA, C. et al. Analysis of a Spontaneous Non-Motile and Avirulent Mutant Shows That FlhM Is Required for Full Endoflagella Assembly in *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0152916, 2016.

FRAUENFELDER, H. C. et al. Effects of dexamethasone on endotoxin shock in the anesthetized pony: hematologic, blood gas, and coagulation changes. **Am J Vet Res**, v. 43, n. 3, p. 405-411, 1982.

GREENE, C.E.; MILLER, M.A.; BROWN, C.A. Leptospirosis. In: GREEN, C.E. (Ed). **Infectious diseases of the dog and cat**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998. p. 273–81.

GRIFFITH, M. E.; HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K. Antimicrobial therapy of leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 19, n. 6, p. 533-537, 2006.

HAAKE, D. A. et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infect Immun**, v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

HAAKE, D. A. et al. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. **Clin Infect Dis**, v. 34, n. 9, p. e40-43, 2002.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 387, n. p. 65-97, 2015.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Mol Microbiol**, v. 77, n. 4, p. 805-814, 2010.

HAAKE, D. A.; ZÜCKERT, W. R. The leptospiral outer membrane. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 387, n. p. 187-221, 2015.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J Mol Biol**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HEATH JR., C. W.; ALEXANDER, A. D.; GALTON, M. M. Leptospirosis in the United States. **The New England Journal of Medicine**, v. 273, p. 857-864, 1965.

HENEGHAN, C. et al. Self-monitoring of oral anticoagulation: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v. 367, n. 9508, p. 404-411, 2006.

HERMANS, P. W. et al. 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and outcome of meningococcal disease. Meningococcal Research Group. **Lancet**, v. 354, n. 9178, p. 556-560, 1999.

HIGGINS, R.; COUSINEAU, G. The pathogenesis of leptospirosis I. Hemorrhages in experimental leptospirosis in guinea pigs. **Can J Comp Med**, v. 41, n. 2, p. 174-181, 1977.

HINES, J. et al. Structure-function analysis of *Yersinia pestis* YopM's interaction with alpha-thrombin to rule on its significance in systemic plague and to model YopM's mechanism of binding host proteins. **Microb Pathog**, v. 30, n. 4, p. 193-209, 2001.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2007.

HUANG, M. et al. Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins. **Nat Struct Biol**, v. 10, n. 9, p. 751-756, 2003.

HUESGEN, P. F. et al. Recombinant Deg/HtrA proteases from *Synechocystis* sp. PCC 6803 differ in substrate specificity, biochemical characteristics and mechanism. **Biochem J**, v. 435, n. 3, p. 733-742, 2011.

INVITROGEN. **BL21 Star™(DE3) One Shot® BL21 Star™(DE3)pLysS One Shot® Chemically Competent Cells.** Disponível em: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/oneshotbl21star_man.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2016.

ITO, T.; YANAGAWA, R. Attachment of antigenic variants of leptospiras to mouse fibroblasts resisting inhibitory effect of anti-parent antiserum. **Jpn J Vet Res**, v. 35, n. 4, p. 251-261, 1987.

IWASAKI, H. et al. Combined antibody and DNA detection for early diagnosis of leptospirosis after a disaster. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 84, n. 4, p. 287-291, 2016.

JACOBS, M. D.; HARRISON, S. C. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. **Cell**, v. 95, n. 6, p. 749-758, 1998.

JOBINS, S. E.; ALEXANDER, K. A. Evidence of *Leptospira* sp. infection among a diversity of African wildlife species: beyond the usual suspects. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 109, n. 5, p. 349-351, 2015.

JOHANSEN, M. E. Hemostasis and endothelial damage during sepsis. **Dan Med J**, v. 62, n. 8, p. B5135, 2015.

JOHNSON, R. C.; ROGERS, P. 5-fluorouracil as a selective agent for growth of *Leptospirae*. **J Bacteriol**, v. 87, n. p. 422-426, 1964.

JOHNSON, R. C.; ROGERS, P. Metabolism of leptospirae. II. The action of 8-azaguanine. **Can J Microbiol**, v. 13, n. 12, p. 1621-1629, 1967.

JOINER, K. A.; MCADAM, K. P.; KASPER, D. L. Lipopolysaccharides from *Bacteroides fragilis* are mitogenic for spleen cells from endotoxin responder and nonresponder mice. **Infect Immun**, v. 36, n. 3, p. 1139-1145, 1982.

JUNCKER, A. S. et al. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. **Protein Sci**, v. 12, n. 8, p. 1652-1662, 2003.

KASSENE, K. et al. Identification of collagenase as a critical virulence factor for invasiveness and transmission of pathogenic *Leptospira* species. **J Infect Dis**, v. 209, n. 7, p. 1105-1115, 2014.

KMETY, E.; DIKKEN, H. **Classification of the species *Leptospira interrogans* and the history of its serovars: a history of the publication of the serovars of leptospires, and a catalogue of their relationships**. Groningen, Netherlands: University Press Groningen, 1993. 104 p.

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

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

KOBE, B.; KAJAVA, A. V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. **Curr Opin Struct Biol**, v. 11, n. 6, p. 725-732, 2001.

KORTE, W.; CLARKE, S.; LEFKOWITZ, J. B. Short activated partial thromboplastin times are related to increased thrombin generation and an increased risk for thromboembolism. **Am J Clin Pathol**, v. 113, n. 1, p. 123-127, 2000.

KOYAMA, T. et al. Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance. **Br J Haematol**, v. 87, n. 2, p. 343-347, 1994.

KRISHNASWAMY, S. The transition of prothrombin to thrombin. **J Thromb Haemost**, v. 11 Suppl 1, n. p. 265-276, 2013.

KUMAR, K. V. et al. Coexistence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with *Azospirillum*. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 91, n. 6, p. pii: fiv051, 2015.

LAMBERT, A. et al. FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. **Infect Immun**, v. 80, n. 6, p. 2019-2025, 2012.

LANGSTON, C. E.; HEUTER, K. J. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 33, n. 4, p. 791-807, 2003.

LAROSA, S. P.; OPAL, S. M. Tissue factor pathway inhibitor and antithrombin trial results. **Crit Care Clin**, v. 21, n. 3, p. 433-448, 2005.

LAW, R. H. et al. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. **Cell Rep**, v. 1, n. 3, p. 185-190, 2012.

LEE, J. W. et al. Clinical Evaluation of Rapid Diagnostic Test Kit Using the Polysaccharide as a Genus-Specific Diagnostic Antigen for Leptospirosis in Korea, Bulgaria, and Argentina. **J Korean Med Sci**, v. 31, n. 2, p. 183-189, 2016.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. Database issue, p. D257-260, 2015.

- LEUNG, K. Y.; REISNER, B. S.; STRALEY, S. C. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. **Infect Immun**, v. 58, n. 10, p. 3262-3271, 1990.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.
- LEVETT, P. N. et al. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, n. Pt 3, p. 671-673, 2006.
- LEVETT, P. N. et al. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. **J Med Microbiol**, v. 54, n. Pt 1, p. 45-49, 2005.
- LEVI, M. Antithrombin in sepsis revisited. **Crit Care**, v. 9, n. 6, p. 624-625, 2005a.
- LEVI, M. Disseminated intravascular coagulation: What's new? **Crit Care Clin**, v. 21, n. 3, p. 449-467, 2005b.
- LEVI, M. The coagulant response in sepsis and inflammation. **Hamostaseologie**, v. 30, n. 1, p. 10-12, 14-16, 2010.
- LEVI, M.; DE JONGE, E.; VAN DER POLL, T. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. **J Thromb Thrombolysis**, v. 16, n. 1-2, p. 43-47, 2003.
- LEVI, M. et al. Disseminated intravascular coagulation. **Thromb Haemost**, v. 82, n. 2, p. 695-705, 1999.
- LEVI, M. et al. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. **JAMA**, v. 270, n. 8, p. 975-979, 1993.
- LEVI, M.; VAN DER POLL, T. The role of natural anticoagulants in the pathogenesis and management of systemic activation of coagulation and inflammation in critically ill patients. **Semin Thromb Hemost**, v. 34, n. 5, p. 459-468, 2008.
- LI, C. et al. Spirochete periplasmic flagella and motility. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v. 2, n. 4, p. 345-354, 2000.
- LI, S. et al. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. **Innate Immun**, v. 16, n. 2, p. 80-92, 2010.
- LIAO, S. et al. Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. **BMC Microbiol**, v. 9, n. 1, p. 253, 2009.
- LIN, S. W. et al. Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. **J Infect**, v. 64, n. 3, p. 325-334, 2012.
- LIN, Y. P. et al. *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen α C domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. **Mol Microbiol**, v. 79, n. 4, p. 1063-1076, 2011.

LO, Y. Y. et al. Essential calcium-binding cluster of *Leptospira* LipL32 protein for inflammatory responses through the Toll-like receptor 2 pathway. **J Biol Chem**, v. 288, n. 17, p. 12335-12344, 2013.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, n. p. 498-499, 1964.

MACIEL, E. A. et al. Household transmission of leptospira infection in urban slum communities. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 1, p. e154, 2008.

MACKMAN, N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 6, p. 1015-1022, 2004.

MADOIWA, S. et al. Plasminogen activator inhibitor 1 promotes a poor prognosis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. **Int J Hematol**, v. 84, n. 5, p. 398-405, 2006.

MAK, P.; ENGHILD, J. J.; DUBIN, A. Hamster antithrombin III: purification, characterization and acute phase response. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 115, n. 1, p. 135-141, 1996.

MALMSTRÖM, J. et al. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 762-765, 2009.

MANN, K. G. et al. The role of the tissue factor pathway in initiation of coagulation. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 9 Suppl 1, n. p. S3-7, 1998.

MAROTTO, P. C. et al. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. **Clin Infect Dis**, v. 29, n. 6, p. 1561-1563, 1999.

MATSUI, M. et al. Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice. **Infect Immun**, v. 79, n. 11, p. 4480-4492, 2011.

MERI, T. et al. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospire. **Microb Pathog**, v. 39, n. 4, p. 139-147, 2005.

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infect Immun**, v. 65, n. 2, p. 729-738, 1997.

MERIEN, F. et al. In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **FEMS Microbiol Lett**, v. 169, n. 1, p. 95-102, 1998.

MESTERS, R. M. et al. Increase of plasminogen activator inhibitor levels predicts outcome of leukocytopenic patients with sepsis. **Thromb Haemost**, v. 75, n. 6, p. 902-907, 1996.

MGODE, G. F. et al. Leptospira Serovars for Diagnosis of Leptospirosis in Humans and Animals in Africa: Common Leptospira Isolates and Reservoir Hosts. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 12, p. e0004251, 2015.

MINETTE, H. P. Leptospirosis in poikilothermic vertebrates. A review. **Int J Zoonoses**, v. 10, n. 2, p. 111-121, 1983.

MIRAGLIOTTA, G. et al. In vitro effect of Leptospira icterohaemorrhagiae on human mononuclear leukocytes: comparison of virulent with non virulent strain. **G Batteriol Virol Immunol**, v. 75, n. 1-6, p. 3-8, 1982.

MIRAGLIOTTA, G.; FUMAROLA, D. In vitro effect of Leptospira icterohaemorrhagiae on human mononuclear leukocytes procoagulant activity: comparison of virulent with nonvirulent strain. **Can J Comp Med**, v. 47, n. 1, p. 70-72, 1983.

MIRAS, I. et al. Structural characterization of a novel subfamily of leucine-rich repeat proteins from the human pathogen Leptospira interrogans. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 71, n. Pt 6, p. 1351-1359, 2015.

MITROPOULOS, K. A.; ESNOUF, M. P. The prothrombin activation peptide regulates synthesis of the vitamin K-dependent proteins in the rabbit. **Thromb Res**, v. 57, n. 4, p. 541-549, 1990.

MIYAHARA, S. et al. Destruction of the hepatocyte junction by intercellular invasion of Leptospira causes jaundice in a hamster model of Weil's disease. **Int J Exp Pathol**, v. 95, n. 4, p. 271-281, 2014.

MOESCHLIN, S. Lungeninfiltrate beim Ikterus infectiosus Weil. **Schweiz Med Wschr**, v.73, n. 3, p. 1227, 1943.

MORGAN, J. et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clin Infect Dis**, v. 34, n. 12, p. 1593-1599, 2002.

NAIMAN, B. M. et al. Protective killed Leptospira borgpetersenii vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. **Infect Immun**, v. 69, n. 12, p. 7550-7558, 2001.

NASCIMENTO, A. L. et al. Comparative genomics of two Leptospira interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J Bacteriol**, v. 186, n. 7, p. 2164-2172, 2004a.

NASCIMENTO, A. L. et al. Genome features of Leptospira interrogans serovar Copenhageni. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 4, p. 459-477, 2004b.

NATARAJASEENIVASAN, K. et al. Surface-associated Hsp60 chaperonin of Leptospira interrogans serovar Autumnalis N2 strain as an immunoreactive protein. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 11, p. 1383-1389, 2011.

NICODEMO, A. C. et al. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 56, n. 2, p. 181-187, 1997.

OKAMOTO, K.; TAMURA, T.; SAWATSUBASHI, Y. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. **J Intensive Care**, v. 4, n. p. 23, 2016.

OLIVEIRA, R. et al. Adhesins of *Leptospira interrogans* mediate the interaction to fibrinogen and inhibit fibrin clot formation in vitro. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2396, 2013.

OPAL, S. M. Therapeutic rationale for antithrombin III in sepsis. **Crit Care Med**, v. 28, n. 9 Suppl, p. S34-37, 2000.

OZURU, R. et al. Adipose tissue is the first colonization site of *Leptospira interrogans* in subcutaneously infected hamsters. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0172973, 2017.

PALANIAPPAN, R. U.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 20, n. 3, p. 284-292, 2007.

PALLEN, M. J.; WREN, B. W. The HtrA family of serine proteases. **Mol Microbiol**, v. 26, n. 2, p. 209-221, 1997.

PALTA, S.; SAROA, R.; PALTA, A. Overview of the coagulation system. **Indian J Anaesth**, v. 58, n. 5, p. 515-523, 2014.

PAPPAS, C. J.; BENAROUDJ, N.; PICARDEAU, M. A replicative plasmid vector allows efficient complementation of pathogenic *Leptospira* strains. **Appl Environ Microbiol**, v. 81, n. 9, p. 3176-3181, 2015.

PARK, S. K. et al. Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: a study of 93 patients. **Am J Trop Med Hyg**, v. 41, n. 3, p. 345-351, 1989.

PATRA, K. P. et al. Comparative analysis of lipopolysaccharides of pathogenic and intermediately pathogenic *Leptospira* species. **BMC Microbiol**, v. 15, n. p. 244, 2015.

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

QUE-GEWIRTH, N. L. et al. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *leptospira interrogans* lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. **J Biol Chem**, v. 279, n. 24, p. 25420-25429, 2004.

RAMOS, C. R. et al. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 8, p. 1103-1109, 2004.

RATET, G. et al. Live imaging of bioluminescent *leptospira interrogans* in mice reveals renal colonization as a stealth escape from the blood defenses and antibiotics. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 12, p. e3359, 2014.

- REIS, E. A. et al. Cytokine response signatures in disease progression and development of severe clinical outcomes for leptospirosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 9, p. e2457, 2013.
- REISNER, B. S.; STRALEY, S. C. Yersinia pestis YopM: thrombin binding and overexpression. **Infect Immun**, v. 60, n. 12, p. 5242-5252, 1992.
- RISTOW, P. et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 7, p. e97, 2007.
- RISTOW, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 5, p. 1309-1317, 2008.
- RIVERA, J. et al. Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. **Thromb Haemost**, v. 98, n. 3, p. 503-511, 2007.
- RUSSELL, R. W. R. Treatment of leptospirosis with oxytetracycline. **Lancet**, v. 2, p. 1143-1145, 1958.
- RUSSELL, K. L. et al. An outbreak of leptospirosis among Peruvian military recruits. **Am J Trop Med Hyg**, v. 69, n. 1, p. 53-57, 2003.
- RUSSELL, T. M.; DELOREY, M. J.; JOHNSON, B. J. Borrelia burgdorferi BbHtrA degrades host ECM proteins and stimulates release of inflammatory cytokines in vitro. **Mol Microbiol**, v. 90, n. 2, p. 241-251, 2013.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SASAKI, D. M. et al. Active surveillance and risk factors for leptospirosis in Hawaii. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 1, p. 35-43, 1993.
- SCHEINMAN, R. I. et al. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. **Science**, v. 270, n. 5234, p. 283-286, 1995.
- SEESOM, W. et al. Detection of Pathogenic Leptospire by Loop-Mediated Isothermal Amplification Targeting LipL32 Gene. **J Med Assoc Thai**, v. 98 Suppl 9, n. p. S78-84, 2015.
- SEGURA, E. R. et al. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. **Clin Infect Dis**, v. 40, n. 3, p. 343-351, 2005.
- SEHGAL, S. C. Leptospirosis on the horizon. **Natl Med J India**, v. 13, n. 5, p. 228-230, 2000.
- SEHGAL, S. C.; MURHEKAR, M. V.; SUGUNAN, A. P. Outbreak of leptospirosis with pulmonary involvement in north Andaman. **Indian J Med Res**, v. 102, n. p. 9-12, 1995.
- SEMERARO, N. et al. Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. **Thromb Res**, v. 129, n. 3, p. 290-295, 2012.

SHIMAUCHI, H. et al. Splenic B-cell activation in lipopolysaccharide-non-responsive C3H/HeJ mice by lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. **Experientia**, v. 52, n. 9, p. 909-917, 1996.

SILLER-MATULA, J. M. et al. Thrombin as a multi-functional enzyme. Focus on in vitro and in vivo effects. **Thromb Haemost**, v. 106, n. 6, p. 1020-1033, 2011.

SIQUEIRA, G. H. et al. Characterization of three novel adhesins of *Leptospira interrogans*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 89, n. 6, p. 1103-1116, 2013.

SIQUEIRA, G. H. et al. *Leptospira interrogans* Lsa23 protein recruits plasminogen, factor H and C4BP from normal human serum and mediates C3b and C4b degradation. **Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 295-308, 2016a.

SIQUEIRA, G. H. et al. The recombinant LIC10508 is a plasma fibronectin, plasminogen, fibrinogen and C4BP-binding protein of *Leptospira interrogans*. **Pathog Dis**, v. 74, n. 2, p. 2016b.

SKRZYPEK, E.; STRALEY, S. C. Interaction between *Yersinia pestis* YopM protein and human alpha-thrombin. **Thromb Res**, v. 84, n. 1, p. 33-43, 1996.

SOUREK, J. et al. Bacterial endotoxins: comparison of mitogenic, polyclonal, antibody-inducing and toxicity activities. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 36, n. 2, p. 192-197, 1991.

SRIMANOTE, P. et al. Recombinant ligA for leptospirosis diagnosis and ligA among the *Leptospira* spp. clinical isolates. **J Microbiol Methods**, v. 72, n. 1, p. 73-81, 2008.

STERN, E. J. et al. Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 6, p. 843-849, 2010.

STODDARD, R. A. et al. Viability of *Leptospira* isolates from a human outbreak in Thailand in various water types, pH, and temperature conditions. **Am J Trop Med Hyg**, v. 91, n. 5, p. 1020-1022, 2014.

SUWANCHAROEN, D. et al. Development of a novel primer combination to detect pathogenic *Leptospira* by loop-mediated isothermal amplification. **J Microbiol Methods**, v. 91, n. 1, p. 171-173, 2012.

SZOTOWSKI, B. et al. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. **Circ Res**, v. 96, n. 12, p. 1233-1239, 2005.

TAJIKI, H.; SALOMÃO, R. Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. **Clin Infect Dis**, v. 23, n. 5, p. 1177-1178, 1996.

TEIXEIRA, A. F. et al. Features of two new proteins with OmpA-like domains identified in the genome sequences of *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122762, 2015.

TOMA, C. et al. Leptospiral outer membrane protein LMB216 is involved in enhancement of phagocytic uptake by macrophages. **Cell Microbiol**, v. 16, n. 9, p. 1366-1377, 2014.

TOMA, C. et al. Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. **Cell Microbiol**, v. 13, n. 11, p. 1783-1792, 2011.

TOYOKAWA, T.; OHNISHI, M.; KOIZUMI, N. Diagnosis of acute leptospirosis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 9, n. 1, p. 111-121, 2011.

TREVEJO, R. T. et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. **J Infect Dis**, v. 178, n. 5, p. 1457-1463, 1998.

TRUCCOLO, J. et al. Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. **FEMS Microbiol Lett**, v. 204, n. 2, p. 317-321, 2001.

TRUEBA, G. et al. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **Int Microbiol**, v. 7, n. 1, p. 35-40, 2004.

VAN DER POLL, T. et al. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. **N Engl J Med**, v. 322, n. 23, p. 1622-1627, 1990.

VAN HINSBERGH, V. W. et al. Progress of fibrinolysis during tumor necrosis factor infusions in humans. Concomitant increase in tissue-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, and fibrin(ogen) degradation products. **Blood**, v. 76, n. 11, p. 2284-2289, 1990.

VELINENI, S.; TIMONEY, J. F. Preliminary evaluation of a dual antigen ELISA to distinguish vaccinated from *Leptospira* infected horses. **Vet Rec**, v. n. p. 2016.

VERMA, I. M. et al. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. **Genes Dev**, v. 9, n. 22, p. 2723-2735, 1995.

VIEIRA, M. L. et al. Interaction of *Leptospira* interrogans with human proteolytic systems enhances dissemination through endothelial cells and protease levels. **Infect Immun**, v. 81, n. 5, p. 1764-1774, 2013.

VIEIRA, M. L. et al. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira* interrogans. **Microb Pathog**, v. 51, n. 5, p. 360-365, 2011.

VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. Interaction of spirochetes with the host fibrinolytic system and potential roles in pathogenesis. **Crit Rev Microbiol**, v. n. p. 1-15, 2015.

VIEIRA, M. L. et al. Modulation of Hemostatic and Inflammatory Responses by *Leptospira* Spp. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 5, p. e0004713, 2016.

VIEIRA, M. L. et al. Plasminogen acquisition and activation at the surface of *leptospira* species lead to fibronectin degradation. **Infect Immun**, v. 77, n. 9, p. 4092-4101, 2009.

VINETZ, J. M. A mountain out of a molehill: do we treat acute leptospirosis, and if so, with what? **Clin Infect Dis**, v. 36, n. 12, p. 1514-1515, 2003.

VOLZ, M. S. et al. Specific CD4+ T-Cell Reactivity and Cytokine Release in Different Clinical Presentations of Leptospirosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. n. p. 2015.

VON JENEY, N.; GÜNTHER, E.; JANN, K. Mitogenic stimulation of murine spleen cells: relation to susceptibility to Salmonella infection. **Infect Immun**, v. 15, n. 1, p. 26-33, 1977.

WAGENAAR, J. F. et al. Coagulation disorders in patients with severe leptospirosis are associated with severe bleeding and mortality. **Trop Med Int Health**, v. 15, n. 2, p. 152-159, 2010.

WAGGONER, J. J.; PINSKY, B. A. Molecular diagnostics for human leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 29, n. 5, p. 440-445, 2016.

WANG, H. et al. Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through Toll-like receptor 2-and 4-mediated JNK and NF- κ B signaling pathways. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42266, 2012.

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

WATT, G. et al. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. **Lancet**, v. 1, n. 8583, p. 433-435, 1988.

WEISEL, J. W. Fibrinogen and fibrin. **Adv Protein Chem**, v. 70, n. p. 247-299, 2005.

WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat Immunol**, v. 2, n. 4, p. 346-352, 2001.

WOLBERG, A. S.; CAMPBELL, R. A. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. **Transfus Apher Sci**, v. 38, n. 1, p. 15-23, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human Leptospirosis**: guidance for diagnosis, Surveillance and control. Geneva: WHO, 2003. ISBN 9241545895. Disponível em: < <http://www.who.int/zoonoses/diseases/Leptospirosis/surveillance.pdf> >. Acesso em: 14 Ago 2016.

WOOD, J. P. et al. Protein S is a cofactor for platelet and endothelial tissue factor pathway inhibitor- α but not for cell surface-associated tissue factor pathway inhibitor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 34, n. 1, p. 169-176, 2014.

WU, B. T. et al. [The OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar lai induces apoptosis in A549 via Ca²⁺ signal pathway]. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 42, n. 3, p. 298-302, 2011.

WU, Q. et al. Activation-induced exposure of the thrombin anion-binding exosite. Interactions of recombinant mutant prothrombins with thrombomodulin and a thrombin exosite-specific antibody. **J Biol Chem**, v. 269, n. 5, p. 3725-3730, 1994.

WUNDER, E. A. et al. A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete. **Mol Microbiol**, v. 101, n. 3, p. 457-470, 2016a.

WUNDER, E. A. et al. Real-Time PCR Reveals Rapid Dissemination of *Leptospira* interrogans after Intraperitoneal and Conjunctival Inoculation of Hamsters. **Infect Immun**, v. 84, n. 7, p. 2105-2115, 2016b.

XIA B. et al. A new model of self-resolving leptospirosis in mice infected with a strain of *Leptospira* interrogans serovar Autumnalis harboring LPS signaling only through TLR4. **Emerg Microbes Infect**, v. 6, p. 36-48, 2017

YANG, C. W. et al. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. **Kidney Int**, v. 69, n. 5, p. 815-822, 2006a.

YANG, H. L. et al. Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation. **BMC Infect Dis**, v. 6, n. p. 19, 2006b.

YU, C. S. et al. Prediction of protein subcellular localization. **Proteins**, v. 64, n. 3, p. 643-651, 2006.

YU, N. Y. et al. PSORTdb--an expanded, auto-updated, user-friendly protein subcellular localization database for Bacteria and Archaea. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. Database issue, p. D241-244, 2011.

ZHANG, L. et al. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. **Mol Microbiol**, v. 83, n. 5, p. 1006-1023, 2012.

ZHANG, W. et al. Inhibitory Effects of Emodin, Thymol, and Astragalin on *Leptospira* interrogans-Induced Inflammatory Response in the Uterine and Endometrium Epithelial Cells of Mice. **Inflammation**, v. n. p. 2017.

ZHANG, W. et al. Toll-Like Receptor 2 Agonist Pam3CSK4 Alleviates the Pathology of Leptospirosis in Hamster. **Infect Immun**, v. 84, n. 12, p. 3350-3357, 2016.

ZUERNER, R. et al. Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v. 2, n. 4, p. 455-462, 2000.

ANEXO

1 Produção Científica obtida durante o período do Doutorado

1.1 Artigos publicados

Zhukova, A., **Fernandes, L. G.**, Hugon, P., et al. (2017). Genome-Wide Transcriptional Start Site Mapping and sRNA Identification in the Pathogen *Leptospira interrogans*. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 10.

Fernandes, L. G., Teixeira, A. F., Filho, A. F., Souza, G. O., Vasconcellos, S. A., Heinemann, M. B., Romero, E. C. & Nascimento, A. L. (2017). Immune response and protective profile elicited by a multi-epitope chimeric protein derived from *Leptospira interrogans*. *Int J Infect Dis*.

Fernandes, L. G., Siqueira, G. H., Teixeira, A. R., Silva, L. P., Figueredo, J. M., Cosate, M. R., Vieira, M. L. & Nascimento, A. L. (2016). *Leptospira* spp.: Novel insights into host-pathogen interactions. *Vet Immunol Immunopathol* **176**, 50-57.

Fernandes, L. G., Filho, A. F., Souza, G. O., Vasconcellos, S. A., Romero, E. C. & Nascimento, A. L. (2016). Decrease in antithrombin III and prothrombin serum levels contribute to coagulation disorders during leptospirosis. *Microbiology* **162**, 1407-1421.

Silva, L. P., **Fernandes, L. G.**, Vieira, M. L., de Souza, G. O., Heinemann, M. B., Vasconcellos, S. A., Romero, E. C. & Nascimento, A. L. (2016). Evaluation of two novel leptospiral proteins for their interaction with human host components. *Pathog Dis* **74**.

Siqueira, G. H., Teixeira, A. F., **Fernandes, L. G.**, de Souza, G. O., Kirchgatter, K., Romero, E. C., Vasconcellos, S. A., Vieira, M. L. & Nascimento, A. L. (2016). The recombinant LIC10508 is a plasma fibronectin, plasminogen, fibrinogen and C4BP-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Pathog Dis* **74**.

Fernandes, L. G., de Moraes, Z. M., Vasconcellos, S. A. & Nascimento, A. L. (2015). *Leptospira interrogans* reduces fibrin clot formation by modulating human thrombin activity via exosite I. *Pathog Dis* **73**.

Domingos, R. F., **Fernandes, L. G.**, Romero, E. C., de Moraes, Z. M., Vasconcellos, S. A. & Nascimento, A. L. (2015). Novel *Leptospira interrogans* protein Lsa32 is expressed during infection and binds laminin and plasminogen. *Microbiology* **161**, 851-864.

Fernandes, L. G., Vieira, M. L., Alves, I. J., de Moraes, Z. M., Vasconcellos, S. A., Romero, E. C. & Nascimento, A. L. (2014). Functional and immunological evaluation of two novel proteins of *Leptospira* spp. *Microbiology* **160**, 149-164.

Vieira, M. L., **Fernandes, L. G.**, Domingos, R. F., Oliveira, R., Siqueira, G. H., Souza, N. M., Teixeira, A. R., Atzingen, M. V. & Nascimento, A. L. (2014). Leptospiral extracellular

matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. *FEMS Microbiol Lett* **352**, 129-139.

Oliveira, R., Domingos, R. F., Siqueira, G. H., **Fernandes, L. G.**, Souza, N. M., Vieira, M. L., de Moraes, Z. M., Vasconcellos, S. A. & Nascimento, A. L. (2013). Adhesins of *Leptospira interrogans* mediate the interaction to fibrinogen and inhibit fibrin clot formation in vitro. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2396.

1.2 Artigos em preparação/submissão

Teixeira, A.F., **Fernandes, L. G.**, de Souza, G. O., Vasconcellos, S.A., Nascimento, A.L. Evaluation of *Leptospira interrogans* Lsa46 and Lsa77 OmpA-like proteins as vaccine candidate. Em preparação

Pereira, P. M., **Fernandes, L. G.**, de Souza, G. O., Vasconcellos, S.A., Romero, E. C., Nascimento, A.L. Multifunctional and Redundant Roles of *Leptospira interrogans* Proteins in Bacterial-Adhesion and fibrin clotting inhibition. *International Journal of Medical Microbiology*. Submetido

Fernandes, R. S., **Fernandes, L. G.**, Miyasato P. A, Nakano E., Farias L. P., Nascimento, A. L, Leite, L. C. Schistosoma mansonii Venom Allergen-Like Protein 18 (SmVAL18) is a novel plasminogen-binding protein secreted during the mammalian host infection. Em preparação.

1.3 Capítulo de livro

Mapeamento de genomas bacterianos: sequenciamento e funcional de *Leptospira*. Renan F. Domingos, Gabriela H. Siqueira, **Luis G. Fernandes**, Aline F. Teixeira, Lucas P. Silva, Maria R. Cosate, Mônica L. Vieira, Ana L. T. O. Nascimento, em “Biotecnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e Aplicações”, Rodrigo Resende e Carlos Ricardo Soccol, eds., 2015.

2 Estágios

Instituto Pasteur, Paris

Departamento de Microbiologia, *Biologie des Spirochètes*

Supervisor de Estágio: Dr. Mathieu Picardeau

Período: Julho/2016 a janeiro/2017

Bolsa: BEPE/Fapesp

Genome-Wide Transcriptional Start Site Mapping and sRNA Identification in the Pathogen *Leptospira interrogans*

OPEN ACCESS

Edited by:

Rey Carabeo,
Washington State University, USA

Reviewed by:

Philip E. Stewart,
Rocky Mountain Laboratories
(NIAID-NIH), USA
Jarlath E. Nally,
United States Department of
Agriculture, USA
Melissa Jo Caimano,
University of Connecticut Health
Center, USA
James Matsunaga,
University of California, Los Angeles,
USA
Haritha Adhikarla,
Yale University, USA

***Correspondence:**

Mathieu Picardeau
mpicard@pasteur.fr

† Present Address:

Azad Eshghi,
Faculty of Dentistry, University of
Toronto, Toronto, Canada

Received: 14 November 2016

Accepted: 06 January 2017

Published: 19 January 2017

Citation:

Zhukova A, Fernandes LG, Hugon P,
Pappas CJ, Sismeiro O, Coppée J-Y,
Becavin C, Malabat C, Eshghi A,
Zhang J-J, Yang FX and Picardeau M
(2017) Genome-Wide Transcriptional
Start Site Mapping and sRNA
Identification in the Pathogen
Leptospira interrogans.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 7:10.
doi: 10.3389/fcimb.2017.00010

Anna Zhukova¹, Luis Guilherme Fernandes², Perrine Hugon^{2,3}, Christopher J. Pappas^{2,4},
Odile Sismeiro⁵, Jean-Yves Coppée⁵, Christophe Becavin¹, Christophe Malabat¹,
Azad Eshghi^{2†}, Jun-Jie Zhang⁶, Frank X. Yang⁶ and Mathieu Picardeau^{2*}

¹ Bioinformatics and Biostatistics Hub, Institut Pasteur, C3BI, Paris, France, ² Biology of Spirochetes Unit, Institut Pasteur, Paris, France, ³ Mutualized Microbiology Platform, Institut Pasteur, Pasteur International Bioresources Network, Paris, France, ⁴ Department of Biology, Manhattanville College, Purchase, NY, USA, ⁵ CITECH, Institut Pasteur, Plate-forme Transcriptome et Epigénome, Pole Biomix – CITECH, Paris, France, ⁶ Department of Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, USA

Leptospira are emerging zoonotic pathogens transmitted from animals to humans typically through contaminated environmental sources of water and soil. Regulatory pathways of pathogenic *Leptospira* spp. underlying the adaptive response to different hosts and environmental conditions remains elusive. In this study, we provide the first global Transcriptional Start Site (TSS) map of a *Leptospira* species. RNA was obtained from the pathogen *Leptospira interrogans* grown at 30°C (optimal *in vitro* temperature) and 37°C (host temperature) and selectively enriched for 5' ends of native transcripts. A total of 2865 and 2866 primary TSS (pTSS) were predicted in the genome of *L. interrogans* at 30 and 37°C, respectively. The majority of the pTSSs were located between 0 and 10 nucleotides from the translational start site, suggesting that leaderless transcripts are a common feature of the leptospiral translational landscape. Comparative differential RNA-sequencing (dRNA-seq) analysis revealed conservation of most pTSS at 30 and 37°C. Promoter prediction algorithms allow the identification of the binding sites of the alternative sigma factor sigma 54. However, other motifs were not identified indicating that *Leptospira* consensus promoter sequences are inherently different from the *Escherichia coli* model. RNA sequencing also identified 277 and 226 putative small regulatory RNAs (sRNAs) at 30 and 37°C, respectively, including eight validated sRNAs by Northern blots. These results provide the first global view of TSS and the repertoire of sRNAs in *L. interrogans*. These data will establish a foundation for future experimental work on gene regulation under various environmental conditions including those in the host.

Keywords: leptospirosis, spirochetes, promoter, transcription factors, RNA

Immune response and protective profile elicited by a multi-epitope chimeric protein derived from *Leptospira interrogans*

Luis G.V. Fernandes^{a,b}, Aline F. Teixeira^{a,b}, Antonio F.S. Filho^c, Gisele O. Souza^c,
Silvio A. Vasconcellos^c, Marcos B. Heinemann^c, Eliete C. Romero^d,
Ana L.T.O. Nascimento^{a,b,*}

^a Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900 Sao Paulo, SP, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, Sao Paulo, SP, Brazil

^c Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Sao Paulo, SP, Brazil

^d Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, Sao Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 December 2016

Received in revised form 4 January 2017

Accepted 25 January 2017

Corresponding Editor: Eskild Petersen, Aarhus, Denmark

Keywords:

Leptospira

Leptospirosis

Vaccine

Chimeric protein

SUMMARY

Introduction: Pathogenic *Leptospira* is the causative agent of leptospirosis, a widely disseminated disease of human and veterinary concern. The development of vaccines that elicit cross-protective immunity through multiple leptospiral serovars has long been pursued. The aim of this study was to develop a novel chimeric multi-epitope fusion antigen, containing sequences of previously studied outer membrane proteins (OMPs) of *Leptospira*.

Methods: The chimeric protein was designed based on the amino acid sequences of the LigA, Mce, Lsa45, OmpL1, and LipL41 proteins, cloned into pAE vector, the protein expressed in *Escherichia coli*, and its immune response evaluated in the hamster infection model.

Results: The recombinant chimeric protein (rChi) was recognized by antibodies present in serum samples of confirmed cases of human leptospirosis and experimentally infected hamsters, demonstrating that the rChi protein participates in the immune response activation during infection. However, despite high antibody titers achieved when the rChi protein was administered with either Alhydrogel or *Bordetella pertussis* monophosphoryl lipid A (MPLA), only 50% of the hamsters were protected against infection.

Conclusions: Although a complete characterization of the immune response elicited by rChi/adjuvant in hamsters is required, it is believed that the construction of chimeric genes is an important attempt towards the generation of an effective vaccine against leptospirosis.

© 2017 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Leptospirosis is a widespread zoonosis caused by pathogenic *Leptospira* spp.^{1–3} The disease is considered a major and emerging public health problem, with an estimated 500 000 severe human leptospirosis cases per year and 100 000 deaths globally.^{4,5} These numbers are probably underestimated due to a combination of factors, including a lack of surveillance, rapid diagnostic tests, and notification in countries with a high disease burden.⁶

Leptospirae are maintained in reservoirs of wild and domestic animals, colonizing their kidneys and being shed intermittently via urine. Humans are considered accidental and terminal hosts in the chain of transmission. They are infected through direct or indirect contact with the urine of infected animals, primarily rats in urban leptospirosis.^{2,3} Symptoms range from a mild influenza-like illness to a severe infection, known as Weil's disease¹ or leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome (LPHS), with a fatality rate of more than 50%.⁷

Currently veterinary vaccines are based on inactivated whole-cell or membrane preparations from pathogenic leptospirae. In some countries, licensed human vaccines, similar to the veterinary ones, are also available.^{8,9} These vaccines, however, have some drawbacks: they confer short-term immunity¹⁰ and elicit protection only against serovars contained in the preparation.² There are

* Corresponding author at: Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900 Sao Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 26279829.

E-mail address: ana.nascimento@butantan.gov.br (A.L.T.O. Nascimento).

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetimm

Leptospira spp.: Novel insights into host–pathogen interactions

Luis G. Fernandes^{a,b}, Gabriela H. Siqueira^{a,b}, Aline R.F. Teixeira^{a,b}, Lucas P. Silva^{a,b},
Jupciana M. Figueredo^{a,b}, Maria R. Cosate^a, Monica L. Vieira^a, Ana L.T.O. Nascimento^{a,b,*}

^a Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900, São Paulo, SP, Brazil

^b Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2015

Received in revised form 9 December 2015

Accepted 10 December 2015

Keywords:

Leptospira

Extracellular matrix

Plasma components

ABSTRACT

Leptospirosis is a widespread zoonosis caused by pathogenic *Leptospira* spp. It is an important infectious disease that affects humans and animals. The disease causes economic losses as it affects livestock, with decreased milk production and death. Our group is investigating the genome sequences of *L. interrogans* targeting surface-exposed proteins because, due to their location, these proteins are capable to interact with several host components that could allow establishment of the infection. These interactions may involve adhesion of the bacteria to extracellular matrix (ECM) components and, hence, help bacterial colonization. The bacteria could also react with the host fibrinolytic system and/or with the coagulation cascade components, such as, plasminogen (PLG) and fibrinogen (Fg), respectively. The binding with the first system generates plasmin (PLA), increasing the proteolytic power of the bacteria, while the second interferes with clotting in a thrombin-catalyzed reaction, which may promote hemorrhage foci and increase bacterial dissemination. Interaction with the complement system negative regulators may help bacteria to evade the host immune system, facilitating the invasion. This work compiles the main described leptospiral proteins that could act as adhesins, as PLG and fibrinogen receptors and as complement regulator binding proteins. We present models in which we suggest possible mechanisms of how leptospires might colonize and invade host tissues, causing the disease. Understanding leptospiral pathogenesis will help to identify antigen candidates that would contribute to the development of more effective vaccines and diagnostic tests.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Leptospira* encompasses both pathogenic and saprophytic species. Pathogenic *Leptospira* are the etiological agents of leptospirosis, while saprophytic ones are environment free-living organisms. *Leptospira* are classified according to serovar status – more than 250 pathogenic serovars have been identified. Structural heterogeneity in lipopolysaccharide moieties seems to be the basis for the great degree of antigenic variation observed among serovars (Plank and Dean, 2000 and Adler and de la Pena Moctezuma, 2010). Some pathogenic species are transmitted through direct contact with mammal hosts, whereas the majority is usually transmitted via contact with contaminated soil and water.

After penetrating the skin via cuts or abrasions, virulent leptospires are able to survive serum complement killing, disseminate in the bloodstream and then, reach target organs, as livers, lungs

and mainly the proximal tubules in kidneys, where they can survive for several months (Bharti et al., 2003).

Leptospirosis is considered an important re-emerging infectious disease that affects human and animals worldwide (Vinetz, 2001 and Bharti et al., 2003). It represents a major economic burden, as the disease promotes abortions, stillbirths, infertility, failure to thrive, reduced milk production and death in animals such as cows, pigs, sheep, goats, horses and dogs (Faine et al., 1999).

Currently available veterinarian vaccines are based on inactivated whole cell or membrane preparations of pathogenic leptospires. These types of vaccine confer protective responses through, but not exclusively, the induction of antibodies against leptospiral lipopolysaccharide (de la Pena-Moctezuma et al., 1999 and Adler and de la Pena Moctezuma, 2010). However, these vaccines do not induce long-term protection against infection and do not provide cross-protective immunity against leptospiral serovars not included in the vaccine preparation. Several research groups have tested the protective activity of several recombinant proteins as potential vaccines (Haake et al., 1999, Branger et al., 2001, Koizumi and Watanabe, 2004, Palaniappan et al., 2006, Chang et al.,

* Corresponding author. Tel.: +55 11 2627 9829.

E-mail address: ana.nascimento@butantan.gov.br (A.L.T.O. Nascimento).

Decrease in antithrombin III and prothrombin serum levels contribute to coagulation disorders during leptospirosis

Luis G. V. Fernandes,^{1,2} Antonio F. S. Filho,³ Gisele O. Souza,³
Silvio A. Vasconcellos,³ Eliete C. Romero⁴ and Ana L. T. O. Nascimento^{1,2}

Correspondence

Ana L. T. O. Nascimento

ana.nascimento@butantan.gov.br

¹Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900, Sao Paulo, SP, Brazil

²Programa de Pos-Graduacao Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, Sao Paulo, SP, Brazil

³Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Avenida Prof. Dr Orlando Marques de Paiva, 87, 05508-270, Sao Paulo, SP, Brazil

⁴Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, Avenida Dr Arnaldo, 355, CEP 01246-902, Sao Paulo, SP, Brazil

Pathogenic bacteria of the genus *Leptospira* are the causative agent of leptospirosis, an emergent infectious disease that affects humans and animals worldwide. Severe forms of the disease in humans include jaundice, multiple organ failure and intense haemorrhage. Up to now, mechanisms associated with the haemorrhage foci are poorly understood. We report in this work that, despite the low levels of antithrombin III in convalescent human serum samples, virulent, culture-attenuated and saprophyte strains of *Leptospira* are unable to bind and/or degrade this thrombin inhibitor, suggesting an indirect mechanism of pathogenesis. Lower levels of prothrombin were found in serum samples at the onset and convalescent phase of the disease when compared to normal human sera. The concomitant decreased levels of antithrombin III and prothrombin suggest a process of stimulated coagulation, which is corroborated by the increase of prothrombin fragment F1 +2 in the serum samples. Data obtained with hamsters experimentally infected with virulent *Leptospira interrogans* serovars Kennewicki and Canicola strongly point out that haemorrhage is correlated with decreased levels of thrombin inhibitors and prothrombin. Activated coagulation might lead to an overconsumption of coagulation factors ultimately leading to bleeding and organ failure.

Received 28 March 2016

Accepted 31 May 2016

INTRODUCTION

Leptospirosis, a zoonosis of global concern and considered a re-emerging disease, is caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*. The spirochaete is actively shed in the urine of infected animals, mainly rodents, and human contamination may occur directly or indirectly, via contaminated water or soil, and bacteria may penetrate the host via cuts or abrasions. It occurs in urban settings of developing countries and in countryside (Bharti *et al.*, 2003).

Pathogenic species of the genus *Leptospira* can cause disease in humans and animals, but the gravity of the disease depends on many issues (Faine *et al.*, 1999; Ko *et al.*, 1999; Plank & Dean, 2000; Levett, 2001). Host infection by pathogenic *Leptospira* causes an assorted array of clinical symptoms, varying from subclinical to jaundice, renal failure, bleeding and pulmonary haemorrhage, acknowledged as a major – often lethal – clinical sign of leptospirosis (Nicodemo *et al.*, 1997; Marotto *et al.*, 1999; Segura *et al.*, 2005; Maciel *et al.*, 2008).

Diverse studies have described possible pathophysiological mechanisms responsible for bleeding in leptospirosis. We have recently demonstrated that leptospires bind human fibrinogen (Oliveira *et al.*, 2013) and human thrombin (Fernandes *et al.*, 2015), reducing fibrin clot formation and possibly interfering with the rheological properties of the

Abbreviations: DIC, disseminated intravascular coagulation; FXa, factor X-activated; HRP, horseradish peroxidase; IAX, infected animal number X; LPF, *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Pomona Fromm; MAT, microscopic agglutination test; PLA, plasmin; PLG, plasminogen; uPA, urokinase.

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of two novel leptospiral proteins for their interaction with human host components

Lucas P. Silva^{1,2}, Luis G. V. Fernandes^{1,2}, Monica L. Vieira¹, Gisele O. de Souza³, Marcos B. Heinemann³, Silvio A. Vasconcellos³, Eliete C. Romero⁴ and Ana L. T. O. Nascimento^{1,2,*,†}

¹Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900, São Paulo, SP, Brazil,

²Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil, ³Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, 05508-270, São Paulo, SP, Brazil and ⁴Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, Avenida Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author: Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, São Paulo, 05503-900, Brazil. Tel: +55 11 37267222; Fax: +55 11 37261505; E-mail: ana.nascimento@butantan.gov.br

One sentence summary: We describe a novel protein in *Leptospira interrogans* that is most probably involved in host-pathogen interactions.

Editor: Richard Marconi

†Ana L. T. O. Nascimento, <http://orcid.org/0000-0003-4851-0870>

ABSTRACT

Pathogenic species of the genus *Leptospira* are the etiological agents of leptospirosis, the most widespread zoonosis. Mechanisms involved in leptospiral pathogenesis are not well understood. By data mining the genome sequences of *Leptospira interrogans* we have identified two proteins predicted to be surface exposed, LIC10821 and LIC10064. Immunofluorescence and proteinase K assays confirmed that the proteins are exposed. Reactivity of the recombinant proteins with human sera has shown that rLIC10821, but not rLIC10064, is recognized by antibodies in confirmed leptospirosis serum samples, suggesting its expression during infection. The rLIC10821 was able to bind laminin, in a dose-dependent fashion, and was called Lsa37 (leptospiral surface adhesin of 37 kDa). Studies with human plasma components demonstrated that rLIC10821 interacts with plasminogen (PLG) and fibrinogen (Fg). The binding of Lsa37 with PLG generates plasmin when PLG activator was added. Fibrin clotting reduction was observed in a thrombin-catalyzed reaction, when Fg was incubated with Lsa37, suggesting that this protein may interfere in the coagulation cascade during the disease. Although LIC10064 protein is more abundant than the corresponding Lsa37, binding activity with all the components tested was not detected. Thus, Lsa37 is a novel versatile adhesin that may mediate *Leptospira*-host interactions.

Keywords: *Leptospira*; leptospirosis; adhesion; plasmin; fibrin reduction

INTRODUCTION

Leptospirosis is a globally disseminated zoonosis caused by pathogenic species of bacteria belonging to the genus *Leptospira*.

The disease is endemic in tropical and subtropical countries, mainly in developing countries, where it produces urban outbreaks during the rainy season (Bharti et al. 2003), while in

RESEARCH ARTICLE

The recombinant LIC10508 is a plasma fibronectin, plasminogen, fibrinogen and C4BP-binding protein of *Leptospira interrogans*

Gabriela H. Siqueira^{1,†}, Aline F. Teixeira^{1,2,†}, Luis G. Fernandes^{1,2}, Gisele O. de Souza³, Karin Kirchgatter⁴, Eliete C. Romero⁵, Silvio A. Vasconcellos³, Monica L. Vieira¹ and Ana Lucia T. O. Nascimento^{1,2,*,†}

¹Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900, Sao Paulo, SP, Brazil,

²Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, ICB, USP, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730,

05508-900, Sao Paulo, SP, Brazil, ³Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS, Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, 05508-270, Sao Paulo,

SP, Brazil, ⁴Núcleo de Estudos em Malária, Superintendência de Controle de Endemias-SUCEN/IMT-SP, USP, Av.

Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470, CEP 05403-000, Sao Paulo, SP, Brazil and ⁵Centro de Bacteriologia, Instituto

Adolfo Lutz, Avenida Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, Sao Paulo, Brazil

*Corresponding author: Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900, Sao Paulo, SP, Brazil. Tel: (5511) 26279829; E-mail: ana.nascimento@butantan.gov.br

[†]These authors have contributed equally to this work.

One sentence summary: The LIC10508 is a key surface protein of *Leptospira interrogans* that binds to several host components that may facilitate the establishment of a leptospirosis infection.

Editor: Ake Forsberg

[‡]Ana Lucia T. O. Nascimento, <http://orcid.org/0000-0003-4851-0870>

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis caused by pathogenic *Leptospira* spp. In this study, we report that the recombinant proteins LIC10507, LIC10508 and LIC10509 are recognized by confirmed leptospirosis serum samples at both phases of the disease. The recombinant rLIC10508 and rLIC10507 are plasminogen (PLG)-binding proteins, capable of generating plasmin in the presence of a PLG activator. The proteins bind to PLG in a dose-dependent and saturable manner, fulfilling host-ligand interaction. Furthermore, rLIC10508 interacts with fibrinogen (Fg), plasma fibronectin and C4b binding protein (C4BP). The binding of rLIC10508 to Fg decreases the fibrin clotting in a thrombin-catalyzed reaction. The incubation with 4 μ M of protein promoted 40% inhibition upon clotting formation. C4BP bound to rLIC10508 retained its cofactor activity for factor I promoting the cleavage of C4b protein, which may reduce the membrane attack complex formation. Although these proteins have high amino acid sequence similarity, rLIC10508 is the most talented of the three, a behavior that might be explained by its unique putative 3D structure, whereas structures of rLIC10507 and rLIC10509 are very similar. Plasmin generation (rLIC10507 and rLIC10508), together with decreasing fibrin clot formation (rLIC10508) and impairment of the complement system (rLIC10508) may help the bacteria to overcome host defense, facilitating the infection process.

Keywords: *Leptospira*; leptospirosis; plasmin; fibrinogen; C4BP; host interactions

RESEARCH ARTICLE

Leptospira interrogans reduces fibrin clot formation by modulating human thrombin activity via exosite I

Luis G. Fernandes^{1,2}, Zenaide M. de Moraes³, Silvio A. Vasconcellos³ and Ana L. T. O. Nascimento^{1,2,*}

¹Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, São Paulo, SP 05503-900, Brazil,

²Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo 05508-900, Brazil and ³Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-270, Brazil

*Corresponding author: Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500 São Paulo, SP 05503-900, Brazil. Tel: +5511-26279829;

E-mail: ana.nascimento@butantan.gov.br

One sentence summary: The binding of pathogenic *Leptospira* to thrombin promoting a decrease in fibrin clotting could lead to hemorrhage, helping bacteria dissemination.

Editor: Richard T. Marconi

ABSTRACT

Pathogenic bacteria of the genus *Leptospira* are the etiological agents of leptospirosis, a disease that affects humans and animals worldwide. Although there are an increasing number of studies on the biology of *Leptospira*, the mechanisms of pathogenesis are not yet understood. We report in this work that *Leptospira interrogans* FIOCRUZ L1-130 virulent, M20 culture attenuated and the saprophyte *L. biflexa* Patoc 1 strains do not bind prothrombin. Leptospiral binding to thrombin was detected with the virulent, followed by culture-attenuated M20, and practically none was observed with the saprophyte strain. The interaction of *Leptospira* with thrombin mostly occurs via exosite I, with a minor participation of catalytic site, as determined by employing the thrombin inhibitors hirugen, hirudin and argatroban. *Leptospira interrogans* binding to thrombin inhibits its catalytic activity reducing fibrin clot formation in thrombin-catalyzed reaction of fibrinogen. This inhibition was more efficient with the virulent FIOCRUZ L1-130 than with the M20 culture attenuated, while none was seen with the saprophyte strain, suggesting that this binding might be important for bacterial virulence. This is the first study reporting the binding of pathogenic *Leptospira* to thrombin promoting a decrease in fibrin clotting that could lead to hemorrhage, helping bacteria dissemination.

Keywords: *Leptospira*; leptospirosis; coagulation; hemorrhage

INTRODUCTION

Leptospirosis is currently the most widespread zoonosis, considered a systemic disease affecting humans and animals (Faine et al., 1999; Bharti et al., 2003). The etiologic agents of leptospirosis are pathogenic bacteria belonging to the genus *Leptospira*. Infection by pathogenic strains of *Leptospira* commonly occurs through direct contact with infected animal urine or indirectly

through contaminated water (Faine et al., 1999; Adler and de la Pena Moctezuma 2010). They infect mammals through active penetration via cuts or abrasion in the skin or through mucous membranes. Through these contamination chains, humans are considered accidental and terminal hosts (Bharti et al., 2003).

While several *Leptospira* species can cause infection and disease in humans and animals, the severity of disease is

Received: 22 October 2014; Accepted: 29 December 2014

© FEMS 2015. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Novel *Leptospira interrogans* protein Lsa32 is expressed during infection and binds laminin and plasminogen

Renan F. Domingos,^{1,2} Luis G. Fernandes,^{1,2} Eliete C. Romero,³
Zenaide M. de Moraes,⁴ Silvio A. Vasconcellos⁴
and Ana L. T. O. Nascimento^{1,2}

Correspondence

Ana L. T. O. Nascimento
ana.nascimento@butantan.gov.br

¹Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900, São Paulo, SP, Brazil

²Programa Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, Avenida Professor Lineu Prestes, 1730, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

³Divisão de Biologia Medica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil

⁴Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Avenida Professor Dr Orlando Marques de Paiva, 87, 05508-270, São Paulo, SP, Brazil

Pathogenic *Leptospira* is the aetiological agent of leptospirosis, a life-threatening disease of human and veterinary concern. The quest for novel antigens that could mediate host–pathogen interactions is being pursued. Owing to their location, these antigens have the potential to elicit numerous activities, including immune response and adhesion. This study focuses on a hypothetical protein of *Leptospira*, encoded by the gene LIC11089, and its three derived fragments: the N-terminal, intermediate and C terminus regions. The gene coding for the full-length protein and fragments was cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21(SI) strain by using the expression vector pAE. The recombinant protein and fragments tagged with hexahistidine at the N terminus were purified by metal affinity chromatography. The leptospiral full-length protein, named Lsa32 (leptospiral surface adhesin, 32 kDa), adheres to laminin, with the C terminus region being responsible for this interaction. Lsa32 binds to plasminogen in a dose-dependent fashion, generating plasmin when an activator is provided. Moreover, antibodies present in leptospirosis serum samples were able to recognize Lsa32. Lsa32 is most likely a new surface protein of *Leptospira*, as revealed by proteinase K susceptibility. Altogether, our data suggest that this multifaceted protein is expressed during infection and may play a role in host–*L. interrogans* interactions.

Received 16 September 2014

Accepted 19 January 2015

INTRODUCTION

Leptospirosis is an infectious disease caused by pathogenic spirochaetes of the genus *Leptospira*. The disease is widespread but more prevalent in tropical and subtropical regions, particularly in developing countries, where it produces urban epidemics with mortality mainly during the rainy season (Bharti *et al.*, 2003). The symptoms are flu-like and include fever, headache, anorexia, muscle pain and constipation (Faine *et al.*, 1999). The most severe form of leptospirosis, known as Weil's syndrome, which occurs

in 5 to 15 % of patients, is a multisystem febrile illness, chiefly with hepatic, renal and pulmonary involvement, with a mortality rate of 5 to 40 % (Bharti *et al.*, 2003; Faine *et al.*, 1999). Leptospirosis is a disease with a great economic impact because it promotes abortions, stillbirths, reduced milk production and death in livestock (Faine *et al.*, 1999; Plank & Dean, 2000).

Functional genomics studies, including transcription profiles, gene cloning, protein expression and characterization, increment bioinformatics analysis and gain insights into bacterial pathogenesis. The genomes of pathogenic *Leptospira* have been sequenced (Bulach *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2004a, b; Ren *et al.*, 2003) and *in silico* analysis has identified more than 250 predicted outer-membrane proteins (Nascimento *et al.*, 2004a, b). These proteins are potential targets for inducing immune responses during host infection

Abbreviations: ACA, 6-aminocaproic acid; CD, circular dichroism; CDS, coding sequence; ECM, extracellular matrix; HRP, horseradish peroxidase; MAT, microscopic agglutination test; OPD, o-phenylenediamine; PK, proteinase K; PLA, plasmin; PLG, plasminogen; RT-PCR, reverse transcription PCR.

Functional and immunological evaluation of two novel proteins of *Leptospira* spp.

Luis G. V. Fernandes,^{1,2} Monica L. Vieira,^{1,2} Ivy J. Alves,¹ Zenaide M. de Moraes,³ Silvio A. Vasconcellos,³ Eliete C. Romero⁴ and Ana L. T. O. Nascimento¹

Correspondence

Ana L. T. O. Nascimento
ana.nascimento@butantan.gov.br

¹Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil

²Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

³Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴Divisão de Biologia Medica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

This work shows the production and characterization of two novel putative lipoproteins encoded by the genes LIC10645 and LIC10731 identified in the genome sequences of *Leptospira interrogans*. *In silico* conservation analysis indicated that the proteins are well conserved among pathogenic leptospiral serovars and species. Recombinant proteins were obtained in *Escherichia coli* BL21(DE3) Star pLysS strain, purified by metal-affinity chromatography, and used for characterization and immunological evaluations. Recombinant proteins were capable of eliciting a combination of humoral and cellular immune responses in animal models, and could be recognized by antibodies present in human serum samples. The recombinant proteins Lsa44 and Lsa45 were able to bind laminin, and were named Lsa44 and Lsa45 for leptospiral surface adhesins of 44 and 45 kDa, respectively. The attachment to laminin was dose-responsive with K_D values of 108.21 and 250.38 nM for Lsa44 and Lsa45, respectively. Moreover, these proteins interact with plasminogen (PLG) with K_D values of 53.56 and 36.80 nM, respectively. PLG bound to the recombinant proteins could be converted to plasmin (PLA) in the presence of an activator. Cellular localization assays suggested that the Lsa44 and Lsa45 were surface-exposed. These are versatile proteins capable of interacting with laminin and PLG/PLA, and hence could mediate bacterial adhesion and contribute to tissue penetration.

Received 5 August 2013

Accepted 24 October 2013

INTRODUCTION

Leptospirosis is a zoonosis of global importance caused by pathogenic bacterial species of the genus *Leptospira* (Bharti *et al.*, 2003; Faine *et al.*, 1999). In urban environments, rodents are the main host reservoirs of leptospires, shedding live bacteria through their urine (Ko *et al.*, 1999; Vinetz *et al.*, 1996). Humans are infected via contact with urine of wild or domestic animal carriers, either directly or indirectly through contaminated water or soil (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). The disease presents a broad spectrum of symptoms, including fever, vomiting, headache, diarrhoea, and abdominal and generalized muscle pain. Due to

these flu-like signs, leptospirosis remains under-diagnosed. Progression to multiorgan system complications, known as Weil's syndrome, occurs in 5–15 % of cases, with mortality rates of 5–40 % (Faine *et al.*, 1999; Ko *et al.*, 1999; Levett, 2001; Plank & Dean, 2000).

Currently available commercial vaccines are based on inactivated whole-cell or membrane preparations of pathogenic leptospires, named bacterins. They confer protective responses mostly through the induction of antibodies against LPS antigens (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010; de la Peña-Moctezuma *et al.*, 1999). Nevertheless, these vaccines do not induce long-term protection against infection and do not provide cross-protective immunity against leptospiral serovars not included in the vaccine preparation (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). Due to the large number of serovars (Bharti *et al.*, 2003), the search for conserved and protective antigens is being pursued (Koizumi & Watanabe, 2005). Leptospiral surface-exposed

Abbreviations: ACA, 6-aminocaproic acid; CD, circular dichroism; Con A, concanavalin A; ECM, extracellular matrix; HRP, horseradish peroxidase; LAL, *Limulus* amoebocyte lysate; MAT, microscopic agglutination test; OPD, o-phenylenediamine; PLA, plasmin; PLG, plasminogen; uPA, urokinase.

Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen–host interactions

Monica L. Vieira¹, Luis G. Fernandes^{1,2}, Renan F. Domingos^{1,2}, Rosane Oliveira^{1,2}, Gabriela H. Siqueira^{1,2}, Natalie M. Souza^{1,2}, Aline R.F. Teixeira^{1,2}, Marina V. Atzingen¹ & Ana L.T.O. Nascimento^{1,2}

¹Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil; and ²Programa Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence: Ana L.T.O. Nascimento, Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil.
Tel.: 5511 2627 9829;
fax: 5511 3726 9233;
e-mail: ana.nascimento@butantan.gov.br

Received 23 August 2013; revised 19 November 2013; accepted 26 November 2013.

DOI: 10.1111/1574-6968.12349

Editor: Mark Schembri

Keywords

leptospirosis; infectious diseases; bacterial diseases.

Abstract

Leptospirosis is been considered an important infectious disease that affects humans and animals worldwide. This review summarizes our current knowledge of bacterial attachment to extracellular matrix (ECM) components and discusses the possible role of these interactions for leptospiral pathogenesis. Leptospiral proteins show different binding specificity for ECM molecules: some are exclusive laminin-binding proteins (Lsa24/LfhA/LenA, Lsa27), while others have broader spectrum binding profiles (LigB, Lsa21, LipL53). These proteins may play a primary role in the colonization of host tissues. Moreover, there are multifunctional proteins that exhibit binding activities toward a number of target proteins including plasminogen/plasmin and regulators of the complement system, and as such, might also act in bacterial dissemination and immune evasion processes. Many ECM-interacting proteins are recognized by human leptospirosis serum samples indicating their expression during infection. This compilation of data should enhance our understanding of the molecular mechanisms of leptospiral pathogenesis.

Introduction

The genus *Leptospira* encompasses both pathogenic and saprophytic species. Pathogenic *Leptospira* are the etiological agents of leptospirosis, while saprophytic bacteria are environment free-living organisms. *Leptospira* are classified according to serovar status – more than 250 pathogenic serovars have been identified. Structural heterogeneity in lipopolysaccharide moieties seems to be the basis for the great degree of antigenic variation observed among serovars. Humans are accidental hosts that become infected through contact with wild or domestic animals or exposure to contaminated soil or water (Adler & de la Pena Moctezuma, 2010).

Leptospire enter the host mainly via intact sodden or damaged skin or mucosa. The initial phase exhibits wide-ranging and nonspecific symptoms such as fever, chills, headache, and myalgia. Leptospirosis can progress to a severe condition known as Weil's syndrome, corresponding to 5–15% of the reported cases. Another severe

manifestation of the disease, the leptospirosis pulmonary hemorrhage syndrome, was first described in North Korea and China and has been increasingly reported worldwide (McBride *et al.*, 2005).

Currently available veterinarian and human vaccines are based on inactivated whole cell or membrane preparations of pathogenic leptospire. However, these vaccines do not induce long-term protection against infection and do not provide cross-protective immunity against leptospiral serovars not included in the vaccine preparation. Several recombinant proteins have been tested as potential vaccines, but only a few are able to confer partial protection against challenge with virulent leptospire (Silva *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2010; Felix *et al.*, 2011).

In the past 10 years, we have witnessed an increase in our knowledge of *Leptospira* and leptospirosis. Modern molecular approaches, such as genomics, proteomics, and mutagenesis, have produced a great amount of data. Several identified proteins have been described to interact with extracellular matrix (ECM) molecules. This review

Adhesins of *Leptospira interrogans* Mediate the Interaction to Fibrinogen and Inhibit Fibrin Clot Formation *In Vitro*

Rosane Oliveira^{1,2}, Renan F. Domingos^{1,2}, Gabriela H. Siqueira^{1,2}, Luis G. Fernandes^{1,2}, Natalie M. Souza^{1,2}, Monica L. Vieira¹, Zenaide M. de Moraes³, Silvio A. Vasconcellos³, Ana L. T. O. Nascimento^{1,2*}

1 Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Programa Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

We report in this work that *Leptospira* strains, virulent *L. interrogans* serovar Copenhageni, attenuated *L. interrogans* serovar Copenhageni and saprophytic *L. biflexa* serovar Patoc are capable of binding fibrinogen (Fg). The interaction of leptospires with Fg inhibits thrombin-induced fibrin clot formation that may affect the haemostatic equilibrium. Additionally, we show that plasminogen (PLG)/plasmin (PLA) generation on the surface of *Leptospira* causes degradation of human Fg. The data suggest that PLA-coated leptospires were capable to employ their proteolytic activity to decrease one substrate of the coagulation cascade. We also present six leptospiral adhesins and PLG-interacting proteins, rLIC12238, Lsa33, Lsa30, OmpL1, rLIC11360 and rLIC11975, as novel Fg-binding proteins. The recombinant proteins interact with Fg in a dose-dependent and saturable fashion when increasing protein concentration was set to react to a fix human Fg concentration. The calculated dissociation equilibrium constants (K_D) of these reactions ranged from 733.3 ± 276.8 to 128 ± 89.9 nM for rLIC12238 and Lsa33, respectively. The interaction of recombinant proteins with human Fg resulted in inhibition of fibrin clot by thrombin-catalyzed reaction, suggesting that these versatile proteins could mediate Fg interaction in *Leptospira*. Our data reveal for the first time the inhibition of fibrin clot by *Leptospira* spp. and presents adhesins that could mediate these interactions. Decreasing fibrin clot would cause an imbalance of the coagulation cascade that may facilitate bleeding and help bacteria dissemination.

Citation: Oliveira R, Domingos RF, Siqueira GH, Fernandes LG, Souza NM, et al. (2013) Adhesins of *Leptospira interrogans* Mediate the Interaction to Fibrinogen and Inhibit Fibrin Clot Formation *In Vitro*. PLoS Negl Trop Dis 7(8): e2396. doi:10.1371/journal.pntd.0002396

Editor: Joseph M. Vinetz, University of California San Diego School of Medicine, United States of America

Received: March 22, 2013; **Accepted:** July 19, 2013; **Published:** August 29, 2013

Copyright: © 2013 Oliveira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by FAPESP (www.fapesp.br, grant 10/52579-4), CNPq (www.cnpq.br) and Fundacao Butantan, Brazil (www.butantan.gov.br/home/fundacao_butantan.php). RO, RFD, GHS, NMS, LGF and MLV have scholarships from FAPESP (Brazil). The funders, FAPESP, CNPq and Fundacao Butantan, had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: tabet@butantan.gov.br.

Introduction

The spirochete *Leptospira interrogans* is a highly invasive pathogen and the causal agent of leptospirosis, one of the most widespread zoonosis of human and veterinary concern [1,2]. The transmission occurs through contact with environmental water contaminated by leptospires shed in the urine of animal carriers [1,3]. Humans are accidental and terminal hosts in the transmission process of leptospirosis. The leptospires enter the body via abrasions on skin or actively through mucosa, spreading to any tissue, and colonizing target organs [4,3]. *Leptospira* can cause damage of the endothelium of small blood vessels, leading to hemorrhage and localized ischemia in multiple organs. As a consequence, renal tubular necrosis, hepatocellular damage and development of leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome (LPHS) may occur in the host [1,5,6]. The mechanisms responsible for bleeding in leptospirosis are poorly understood. Hemolysins could play an important role in this toxic response and several genes coding for predicted hemolysins were identified in the genome

sequencing *L. interrogans* [7]. Yet, when evaluated, these proteins failed to show hemolytic activity in human erythrocytes [8,9].

Fg and PLG are key proteins in the coagulation cascade and fibrinolysis, respectively, and critical determinants of bacterial virulence and host defense [10]. Fg is the major clotting protein present in blood plasma with an important role in blood coagulation and thrombosis. PLG under the action of its activators generates PLA, a serine-protease capable of degrading ECM components, fibrin, facilitating the pathogen penetration and invasion [11].

We have previously shown that PLA-associated *Leptospira* renders the bacteria with proteolytic activity capable of degrading ECM components [12] that in turn, may help bacterial penetration and dissemination. Furthermore, PLA-coated leptospires have also shown to degrade IgG and C3b that could facilitate the bacterial immune evasion [13]. The adhesion of physiological osmotically induced *Leptospira* with Fg was described but their effect on fibrin formation was not ascertained [14]. The leptospiral proteins LigB and OmpL37 were shown to interact