LIGIA MARIA PIASSI RICARDI

**“Identificação de proteínas secretadas por duas espécies de *Leptospira*,
uma patogênica e uma saprófita”**

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

São Paulo
2013

LIGIA MARIA PIASSI RICARDI

**“Identificação de proteínas secretadas por duas espécies de *Leptospira*,
uma patogênica e uma saprófita”**

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: Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu
de Aniz

Co-orientadora: Dra. Angela Silva Barbosa

Versão original

São Paulo
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Piassi-Ricardi, Ligia Maria.

Identificação de proteínas secretadas por duas espécies de *Leptospira*, uma patogênica e uma saprófita / Ligia Maria Piassi-Ricardi. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Análise proteômica e caracterização funcional de proteínas secretadas por *Leptospira*.

Versão do título para o inglês: Identification of secreted proteins by two species of *Leptospira*, one pathogenic and one saprophyte.

1. Leptospirose 2. Proteínas 3. Secreção 4. Patogenia 5. Proteoma 6. Exoproteoma I. Abreu, Profa. Dra. Patrícia Antonia Estima II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB05/2013

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

Candidato(a): Ligia Maria Piassi Ricardi.

Título da Tese: Identificação de proteínas secretadas por duas espécies de *Leptospira*, uma patogênica e uma saprófita.

Orientador(a): Profa. Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Identificação e caracterização funcional de proteínas secretadas por duas espécies de *Leptospira*, uma patogênica e uma saprófita", protocolado sob o nº 1945/2010, utilizando 60 (sessenta) hamsters, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 30/06/2010.

We certify that the Research "Identification and functional characterization of secreted proteins by two species of *Leptospira*, one pathogenic and one saprophytic", protocol number 1945/2010, utilizing 60 (sixty) hamsters, under the responsibility Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/30/2010.

São Paulo, 01 de julho de 2010

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Neste momento quero agradecer...

Àquele que me fortalece, em quem confio e a tudo entrego, à Deus que me deu a oportunidade de viver, andar, enxergar, ouvir e aprender.

e dedicar este trabalho...

Aos meus Pais, que em sua simplicidade me deram mais do que uma boa educação, me ensinaram os valores do respeito ao próximo, da virtude e da dignidade; que sempre me apoiaram a seguir o meu caminho e a fazer o que me fizesse feliz.

Ao meu maior companheiro, Daniel, que ao meu lado sempre me incentiva e me apoia, que me valoriza como pesquisadora e que preza pela minha formação acadêmica, que respeita minha escolha e me proporciona a tranquilidade de segui-la. Te amo.

A toda minha família, em especial à minha irmã Nil, a quem por admiração procurei seguir os passos, buscando na pesquisa um pouco da beleza do doar-se à área da saúde.

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora Dra. Patrícia Antônia Estima Abreu, exemplo de pessoa, pesquisadora e mulher. Que me recebeu em seu laboratório e acreditou no meu trabalho e me ensinou muito mais do que estas próximas páginas podem contar. Serei sempre grata por ter me acolhido não só como aluna, mas como filha. Eu sinto que você me segurou pelas mãos e me ensinou a caminhar.

À minha Co-orientadora Dra. Angela Silva Barbosa, pelo incentivo, convívio e amizade.

Às minhas amigas do laboratório, companheiras do dia a dia, com quem aprendi e dividi muito da minha vida, à quem deixei um pouco de mim e das quais levo comigo muito: Amane, Demétria, Denize, Lídia, Ludmila, Tatiana e Vanessa, vocês fazem parte desta conquista.

Ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, na figura de seus funcionários, alunos e pesquisadores, muito obrigada.

Aos professores e funcionários do Programa Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo por todo o ensinamento e trabalho prestado.

Ao Instituto Butantan, instituição que me acolheu e da qual me orgulho em fazer parte.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e em especial ao Laboratório de Epidemiologia e Zoonoses Bacterianas na figura do Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, Zenaide, Gisele, pela manutenção das culturas de leptospira, sem as quais este trabalho não teria acontecido.

À Dra. Fernanda Calheta Vieira Portaro e seus alunos Daniela e Alexandre do Laboratório de Imunoquímica (Instituto Butantan) pela colaboração, uso das dependências e equipamentos do laboratório para a realização dos ensaios de atividade enzimática.

À Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo e sua aluna Karen e demais alunos do Laboratório de Herpetologia (Instituto Butantan) pela colaboração, uso das dependências e equipamentos do laboratório.

Ao Laboratório Nacional de Biosciências (LNBio - Campinas), na figura da Dra. Adriana Franco Paes Leme e da Técnica de laboratório Romenia Ramos Domingues pelo auxílio no uso das dependências e equipamentos do laboratório de espectrometria de massa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Pró-Reitoria de Pós-Graduação da USP pelo apoio financeiro.

Aos demais pesquisadores, estudantes e funcionários do Instituto Butantan que direta ou indiretamente auxiliaram no meu crescimento e aprendizado.

*Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso aprendemos sempre.*

Paulo Freire

RESUMO

PIASSI-RICARDI, L. M. **Identificação de proteínas secretadas por duas espécies de *Leptospira*, uma patogênica e uma saprófita.** 2013. 182 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Os mecanismos pelos quais as leptospiros invadem o hospedeiro e causam a doença não são ainda completamente compreendidos. Resultados experimentais demonstraram que a patogênese pode estar relacionada com a capacidade destas bactérias em aderir a proteínas da matriz extracelular, escapar da resposta imune do hospedeiro e de produzir toxinas. Este trabalho teve como objetivo identificar proteínas secretadas por *Leptospira interrogans* sorovar Pomona estirpe Fromm kennewicki (patogênica) e *Leptospira biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (saprófito), através de análise proteômica. As leptospiros foram cultivadas em meio EMJH suplementado com soro de coelho ou albumina bovina (BSA). Os sobrenadantes foram filtrados, dialisados e liofilizados. As amostras de proteínas secretadas foram submetidas à eletrofocalização em fitas de pH de 3 a 10. Posteriormente, as fitas foram processadas para a separação na segunda dimensão em gel de SDS-PAGE 12,5%. Os spots detectados foram recortados do gel bidimensional e submetidos ao procedimento de descoloração e digestão com tripsina in situ. Amostras complexas de proteínas secretadas também foram submetidas à digestão com tripsina sem a separação em géis bidimensionais. A análise dos peptídeos obtidos, nos dois procedimentos, foi realizada utilizando-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem. Um dos principais obstáculos para os estudos de secretomas é a dificuldade na obtenção de extratos de proteínas secretadas sem contaminação citoplasmática. Além disso, a extração de proteínas com baixa concentração a partir de grandes volumes de meio de cultura, que são ricos em sais, BSA e outros compostos, frequentemente interfere com a maioria das técnicas proteômicas. Por estes motivos, várias abordagens experimentais foram utilizadas para otimizar o protocolo aplicado. Apesar deste fato, foi possível a identificação de 159 proteínas diferentes nas amostras de *L.interrogans*, entre as quais 64 foram positivas em pelo menos uma das ferramentas usadas para a predição. Em *L. biflexa*, 104 proteínas diferentes foram identificadas, entre elas 43 proteínas foram positivas pela análise in silico. Entre as proteínas identificadas, estão aquelas que possuem peptídeo sinal sec ou tat dependentes. Em outras, a predição da localização celular é desconhecida ou podem ter múltiplos sítios de localização, e ainda, proteínas que não possuem peptídeo sinal e que podem ser secretadas por mecanismos não convencionais. Muitos destas são proteínas hipotéticas sem domínios conservados detectados. No que diz respeito à atividade proteolítica, foi identificada a presença de metaloproteases no secretoma de *L.interrogans*. Não houve detecção da presença significativa de proteases bacterianas em amostras de *L. biflexa*. A identificação e a caracterização funcional de proteínas secretadas poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos patogênicos e no desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento e prevenção de leptospirose.

Palavras-chave: Leptospirose. *Leptospira*. Exoproteoma. Proteínas secretadas.

ABSTRACT

PIASSI-RICARDI, L M. **Identification of secreted proteins of two species of *Leptospira* species, one pathogenic and one saprophyte.** 2013. 182 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Leptospirosis is a zoonosis of worldwide distribution caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. The mechanisms by which leptospires invade the host and cause the disease are not yet fully understood. Experimental results have shown that the pathogenesis may be related to the ability of these bacteria to bind to extracellular matrix proteins, to escape host's immune responses and to produce toxins. This work aimed to identify secreted proteins by *Leptospira interrogans* serovar Pomona strain Fromm kennewicki (pathogenic) and *Leptospira biflexa* serovar strain Patoc Patoc I (saprophyte) through proteomic analysis. The leptospires were grown in EMJH supplemented with rabbit serum or bovine serum albumin (BSA). Supernatants were filtered, dialyzed and lyophilized. Samples of secreted proteins were subjected to electrofocusing on pH 3 to 10 strips. Subsequently, the strips were processed for separation in the second dimension in SDS-PAGE 12.5%. The detected spots were cut out from the gel and subjected to two-dimensional procedure discoloration and trypsin digestion in situ. Secreted proteins from complex samples were also subjected to digestion with trypsin without separation into two-dimensional gels. The analysis of the obtained peptides in two procedures was performed using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. One major obstacle to secretome studies is the difficulty to obtain extracts of secreted proteins without cytoplasmatic contamination. In addition, the extraction of low concentration proteins from large volumes of culture media, which are rich in salts, BSA and other compounds, frequently interfere with most proteomics techniques. For these reasons, several experimental approaches were used to optimize the protocol applied. In spite of this fact, it was possible to identify 159 different proteins in the samples of *L.interrogans*; among them, 64 were positive proteins in at least one of the tools used for prediction. In *L. biflexa*, 104 different proteins were identified; among them, 43 positive proteins were positive by in silico analysis. Among the identified proteins are those that possess sec or tat dependent signal peptide. In others, the prediction of the cellular location is unknown or may have multiple sites of localization, and even proteins which have no signal peptide can be secreted by unconventional mechanisms. Many of these are hypothetical proteins with no detected putative conserved domains. The presence of metalloproteases has been identified in the *L.interrogans*' secretome, using proteolytic assay. There was no significant detection of the presence of bacterial proteases in samples of *L. biflexa*. The identification and functional characterization of secreted proteins may contribute to the elucidation of pathogenic mechanisms and in the developing of new strategies for the treatment and prevention of leptospirosis.

Keywords: Leptospirosis. *Leptospira*. Exoproteome. Secreted Proteins.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
BSA	Albumina bovina sérica
2DE	Eletroforese bidimensional
2DE-PAGE	Gel bidimensional
DTT	Dithiothreitol
EMJH	<i>Ellinghausen McCullough Johnson Harris</i> (meio de cultura padrão para leptospiros)
ESI-QUAD-TOF	<i>Electrospray quadripole time of flight</i>
HPLC	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i> (<i>High Performance/Pressure Liquide Chromatography</i>)
IAA	Iodoacetamida
kDa	Kilodalton
LC/MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em sequência (<i>Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry</i>)
LMW	Padrão de baixo peso molecular (<i>Low molecular weight</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MAT	Teste de aglutinação microscópica
mM	Milimolar
m/v	Massa/volume
mA	Miliampere
Nm	Nanômetro
OMP	Proteína de membrana externa (<i>outer membrane protein</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato (<i>phosphate buffer saline</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
seg	Segundo
SRP	Partícula de reconhecimento do sinal (<i>signal recognition particle</i>)
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
W	Watt
V	Volts
v/v	Volume/volume

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Resumo dos sistemas de secreção descritos em bactérias	24
Figura 2 - Cinética de cultivo das estirpes de <i>L. interrogans</i> (LPF) e <i>L. biflexa</i> (Patoc) em meio EMJH enriquecido com 10% de soro de coelho.....	42
Figura 3 - Análise das amostras do primeiro protocolo de obtenção das proteínas secretadas a partir dos sobrenadantes de <i>L. interrogans</i> e <i>L. biflexa</i> cultivadas em meio EMJH enriquecido com 1% de soro de coelho, em gel de poliacrilamida (SDS-Page 12 %) corado com <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	44
Figura 4 - Análise das amostras do segundo protocolo de obtenção do extrato de proteínas secretadas a partir dos cultivos de <i>L. interrogans</i> e <i>L. biflexa</i> em meio EMJH enriquecido com 10 % de soro de coelho, em gel de poliacrilamida (SDS-Page 12 %) corado com <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	45
Figura 5 - Análise das amostras do terceiro protocolo de obtenção das proteínas secretadas de <i>L. interrogans</i> e <i>L. biflexa</i> cultivadas em meio EMJH enriquecido com 10 de soro de coelho, em gel de poliacrilamida (SDS-Page 12) corado com <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	46
Figura 6 - Resumo do fluxograma final para obtenção das proteínas secretadas por <i>Leptospiras</i> spp.....	47
Figura 7 - Gel bidimensional teórico de proteínas (em preto) e secretadas pelo sistema Sec dependente (em vermelho) de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni estirpe L1-130.	48
Figura 8 - Gel bidimensional teórico de proteínas totais (em preto) e secretadas pelo sistema Sec dependente (em vermelho) de <i>Leptospira biflexa</i> sorovar Patoc estirpe Patoc 1 - Paris...	49
Figura 9 - Gel bidimensional de proteínas secretadas pela <i>L. interrogans</i> (GEL A). Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com BSA.....	51
Figura 10 - Gel bidimensional de proteínas secretadas pela <i>L. interrogans</i> (GEL B). Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com soro de coelho	52
Figura 11 - Gél bidimensional de proteínas secretadas pela <i>L. biflexa</i> (GEL C). Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com BSA.....	53

Figura 12 - Gel bidimensional de proteínas secretadas pela <i>L. biflexa</i> (GEL D). Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com soro de coelho.	54
Figura 13 - Triplicata dos géis bidimensionais de proteínas secretadas pela <i>L. interrogans</i> Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com BSA.	57
Figura 14 - Triplicata dos géis bidimensionais de proteínas secretadas pela <i>L. interrogans</i> Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com soro de coelho.	58
Figura 15 - Triplicata dos géis bidimensionais de proteínas secretadas pela <i>L. biflexa</i> . Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com BSA.	58
Figura 16 - Triplicata dos géis bidimensionais de proteínas secretadas pela <i>L. biflexa</i> Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com soro de coelho.	59
Figura 17 - Comparação das análises da provável localização das proteínas identificadas nos extratos de proteínas secretadas de <i>L.interrogans</i> (A) e <i>L.biflexa</i> (B).	74
Figura 18 - Avaliação da atividade enzimática das amostras de proteínas secretadas pela <i>L. interrogans</i> , utilizando-se o substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp.	78
Figura 19 - Avaliação da atividade enzimática das amostras de proteínas secretadas pela <i>L. interrogans</i> , utilizando os substratos análogos a dinorfina (gráfico A) e da bradicinina (gráfico B).	80
Figura 20 - Cromatograma representativo das reações de hidrólise da cadeia β da insulina incubada com os extratos de proteínas secretadas por <i>L. interrogans</i> cultivadas com enriquecimento BSA (vermelho) e SORO (azul).	82
Figura 21 - Cromatograma representativo das reações de hidrólise da cadeia β da insulina incubada com os extratos de proteínas secretadas por <i>L. biflexa</i> cultivadas com enriquecimento BSA (vermelho) e SORO (azul) e controle negativo (bordô).	83
Figura 22 - Cromatograma representativo das reações de hidrólise da cadeia beta da insulina incubada com o extrato de proteínas secretadas por <i>L. interrogans</i> e inibidores classe específicos (PMSF e 1-10 fenatrolina).	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos resultados obtidos a partir dos géis bidimensionais.....	55
Tabela 2 - Resumo dos resultados obtidos com as amostras líquidas.	62
Tabela 3 - Proteínas com sequência sinal Sec-dependente identificadas no extrato de proteínas extracelulares de <i>L.interrogans</i>	63
Tabela 4 - Proteínas com sequência sinal Sec-dependente identificadas no extrato de proteínas extracelulares de <i>L.biflexa</i>	64
Tabela 5 - Proteínas secretadas por mecanismos não clássicos identificadas no extrato de proteínas extracelulares de <i>L.interrogans</i>	68
Tabela 6 - Proteínas secretadas por mecanismos não clássicos identificadas no extrato de proteínas extracelulares de <i>L.biflexa</i>	69
Tabela 7 - Análise <i>in silico</i> da provável localização das proteínas utilizando o programa PSORTb 3.0.....	71
Tabela 8 - Análise <i>in silico</i> da provável localização das proteínas identificadas no extrato de proteínas extracelulares de <i>L.interrogans</i> utilizando o programa PSORTb 3.0.....	72
Tabela 9 - Análise <i>in silico</i> da provável localização das proteínas identificadas no extrato de proteínas extracelulares de <i>L.biflexa</i> utilizando o programa PSORTb 3.0.....	72
Tabela 10 - Avaliação das atividades enzimática dos extratos de proteínas secretadas por <i>L. interrogans</i> e <i>L. biflexa</i> , na presença e ausência de inibidores de proteases incubadas com a cadeia beta da insulina e avaliadas por HPLC.....	85

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Estirpes bacterianas	33
3.2	Obtenção das proteínas secretadas.....	33
3.3	Eletroforese unidimensional.....	34
3.4	Eletroforese bidimensional.....	35
<i>3.4.1</i>	<i>Isoeletrofocalização</i>	<i>35</i>
<i>3.4.2</i>	<i>Eletroforese bidimensional SDS-PAGE</i>	<i>35</i>
<i>3.4.3</i>	<i>Espectrometria de massas</i>	<i>36</i>
<i>3.4.4</i>	<i>Digestão enzimática de spots proteicos</i>	<i>37</i>
<i>3.4.5</i>	<i>Digestão enzimática de amostras complexas em solução.</i>	<i>37</i>
<i>3.4.6</i>	<i>Obtenção e análise dos espectros de massa dos peptídeos tripticos.....</i>	<i>38</i>
<i>3.4.7</i>	<i>Identificação das proteínas em bancos de dados a partir do mapa de peptídeos.....</i>	<i>39</i>
3.5	Análises <i>in silico</i>	39
3.6	Ensaio de atividade enzimática	39
<i>3.6.1</i>	<i>Ensaio Fluorimétrico.....</i>	<i>39</i>
<i>3.6.2</i>	<i>Ensaio Cromatográfico</i>	<i>40</i>
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	Obtenção do extrato de proteínas secretadas	42
4.2	Identificação de proteínas secretadas utilizando eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.....	47
4.3	Repetição dos géis para confirmação do perfil bidimensional dos extratos de proteínas secretadas utilizando eletroforese em segunda dimensão	56
4.4	Identificação de proteínas secretadas utilizando amostras líquidas e espectrometria de massas	61

4.5	Análise in silico dos prováveis mecanismos envolvidos na secreção de proteínas identificadas de <i>L.interrogans</i> e <i>L.biflexa</i>	62
4.5.1	<i>Proteínas com peptídeo sinal Sec-dependente</i>	63
4.5.2	<i>Proteínas com peptídeo sinal Tat-dependente</i>	66
4.5.3	<i>Proteínas secretadas por mecanismos não clássicos</i>	67
4.5.4	<i>Análise da provável localização das sequências de proteínas anotadas nos genomas de <i>Leptospiras spp.</i> e das proteínas identificadas de <i>L. interrogans</i> e <i>L. biflexa</i>.</i>	71
4.6	Comparação das análises da provável localização das proteínas identificadas de <i>L.interrogans</i> e <i>L.biflexa</i>	74
4.7	Comparação qualitativa das proteínas identificadas na espécie saprofítica e patogênica usando a ferramenta BlastP	77
4.8	Ensaio de atividade enzimática	77
4.8.1	<i>Ensaio Fluorimétrico</i>	77
4.8.2	<i>Ensaio cromatográfico</i>	81
5	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICE A - Listas de proteínas identificadas a partir dos géis bidimensionais	99
	APÊNDICE B - Listas de proteínas identificadas a partir das análises de amostras complexas em solução	111
	APÊNDICE C - Lista de proteínas comparadas qualitativamente usando a ferramenta de bioinformática BlasP	171

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose emergente de importância mundial, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Amplamente disseminada, principalmente, em países de clima tropical e subtropical (HARTSKEER et al., 2011; KO et al., 1999).

As leptospirosas patogênicas colonizam os túbulos renais proximais de um grande número de espécies animais domésticos e silvestres e são liberadas no ambiente externo pela urina. A transmissão ocorre por meio de contato direto com animais infectados ou, mais frequentemente, pela exposição à água, alimentos e solo contaminados com urina (BHARTI et al., 2003; FARR, 1995).

Esta doença foi descrita, oficialmente, em 1886, por Adolf Weil, ao avaliar pacientes, que apresentavam esplenomegalia, nefrite e icterícia. E, passou a ser conhecida como síndrome de Weil em sua homenagem. Apesar da existência de relatos de casos de leptospirose em civilizações antigas, somente em 1915, Inada et al. conseguiram isolar o agente causador da doença e, em 1917, demonstraram que os ratos eram os principais reservatórios para a transmissão aos humanos. Noguchi et al. (1918) propuseram a criação do gênero *Leptospira*, pelo fato da bactéria possuir forma espiralada. Nos dias atuais, a doença é denominada leptospirose e sua forma grave ficou conhecida como sinônimo da síndrome de Weil (LEVETT, 2001).

O gênero *Leptospira*, pertencente à família *Leptospiraceae* e a ordem *Spirochaetales*, foi, inicialmente, dividido em duas espécies; a espécie *L. interrogans* que compreendia todas as estirpes patogênicas, e a *L. biflexa* com as saprófitas, isoladas do meio ambiente. Yasuda et al. (1987) propuseram uma nova classificação baseada na homologia do DNA e recentemente, então, o gênero foi reclassificado. São conhecidas oito espécies patogênicas (*L. interrogans*, *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii* e *L. alstoni*), sete espécies saprófitas (*L. biflexa* (senso estrito), *L. wolbachii*, *L. kmetyi*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae* and *L. yanagawae*), além de um grupo intermediário com cinco espécies (*L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii* e *L. licerasiae*), cuja patogenicidade não foi confirmada (FAINE et al., 1999; KO et al., 2009; YASUDA et al., 1987).

As leptospirosas também são classificadas em sorovares definidos por reações de aglutinação após absorção dos soros com antígenos homólogos. Os sorovares antigenicamente relacionados são reunidos num mesmo sorogrupo. Existem cerca de 250 sorovares de leptospirosas patogênicas e saprófitas descritos em 23 sorogrupos (FAINE et al., 1999). Esta variedade antigênica se deve à heterogeneidade da estrutura na composição do LPS

(lipopolissacarídeo). A classificação fenotípica em sorovar é amplamente utilizada devido à sua importância epidemiológica e clínica, embora, não se correlacione com a classificação genética (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; LEVETT, 2001).

Cada sorovar de leptospira está, geralmente, adaptado a uma espécie particular de hospedeiro, conhecido como hospedeiro de manutenção (reservatório), como por exemplo, a *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo e a *L. interrogans* sorovar Hardjo em bovinos, a *L. interrogans* sorovar Canicola em cães, a *L. interrogans* sorovar Pomona em suínos, e *L. interrogans* sorovar Copenhageni em ratos. Nestes, a doença manifesta-se de maneira subclínica e crônica com eliminação de leptospiros pela urina (leptospiúria) durante longo período ou por toda a vida, tornando-os a principal fonte de contaminação ambiental para as outras espécies animais, denominadas hospedeiros acidentais, que desenvolvem a forma clínica da doença (FAINE et al., 1999).

Em áreas urbanas, os principais reservatórios de leptospiros são os roedores sinantrópicos das espécies *Rattus norvegicus* (rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato de telhado) e *Mus musculus* (camundongo). Os seres humanos são hospedeiros acidentais e a transmissão entre pessoas é rara, apesar das leptospiros serem eliminadas por vários meses após a infecção. A *L. interrogans* prevalece como a espécie que mais causa leptospirose em seres humanos em todo o mundo (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001).

As bactérias do gênero *Leptospira* são móveis, aeróbias estritas e diferenciam-se das outras espiroquetas por possuírem a célula terminada em gancho e apresentar dois flagelos periplasmáticos (LEVETT, 2001, 2003). Não se coram bem com corantes bacteriológicos convencionais e são visualizadas utilizando-se microscópio de campo escuro ou de contraste de fase. Podem ser identificadas nos tecidos pela impregnação por prata, ou pelo emprego de imunohistoquímica (ALEXANDER et al., 1986). As leptospiros sobrevivem em solo úmido ou na água, que tenha pH neutro ou alcalino (LOMAR et al., 2000). A aparência e motilidade variam conforme a natureza do meio em que crescem (BHARTI et al., 2003). São capazes de formar agregados celulares e biofilmes (RISTOW et al., 2008; TRUEBA et al., 2004), o que parece contribuir para manutenção destas bactérias em condições ambientais hostis e favorecer a colonização dos túbulos renais durante a infecção crônica, entretanto, ainda não existem evidências experimentais que suportem estas hipóteses (MONAHAN et al., 2009).

Na cultura *in vitro*, as leptospiros utilizam amônia como fonte de nitrogênio (JOHNSON; ROGERS, 1964) e ácidos graxos de cadeia longa como fonte de carbono e energia (JOHNSON; WALBY, 1972) através da β -oxidação dos ácidos graxos (BASEMAN; COX, 1969).

A incidência da doença é significativamente mais alta em países tropicais do que em países de clima temperado, provavelmente devido ao clima quente e úmido o qual favorece a sobrevivência das leptospiros. Em países desenvolvidos, a infecção em humanos está principalmente relacionada a exposições ocupacionais, recreativas e esportivas já que profissionais como veterinários, agricultores e trabalhadores de serviços de água e esgoto, por exemplo, bem como praticantes de esportes aquáticos, podem ter contato direto com água e solo contaminados (MCBRIDE et al., 2005). Em países em desenvolvimento, a doença está diretamente relacionada a condições inadequadas de moradia, ausência de saneamento básico e à alta infestação por roedores infectados (BHARTI et al., 2003; KO et al., 1999; LOMAR et al., 2000).

No Brasil, a leptospirose é considerada um problema de saúde pública e de notificação compulsória. Apresenta-se endêmica em todo o território nacional, podendo apresentar caráter epidêmico em períodos chuvosos, devido aos grandes alagamentos (REIS et al., 2008). Além disso, a deficiência em pronto atendimento e o diagnóstico tardio são fatores que também contribuem para a instalação da doença, principalmente devido ao quadro clínico da leptospirose humana ser muito parecido com o de outras doenças, como dengue e hepatite viral, que normalmente ocorrem no mesmo período do ano, este atraso no diagnóstico correto, em muitos casos, leva ao agravamento e ao óbito do paciente (BHARTI et al., 2003; DE SOUZA et al., 2007).

Dados do Ministério da Saúde mostram que, no Brasil, no período entre 2002 e maio de 2012, 37548 casos de leptospirose foram confirmados e destes 3.847 chegaram a óbito (BRASIL, 2011). No entanto, a Sociedade Internacional de leptospirose indica que existe subnotificação de casos, principalmente devido às dificuldades de confirmação diagnóstica.

Na pecuária, a doença é responsável por grandes perdas econômicas, pois influencia diretamente o potencial reprodutivo dos animais, podendo causar infertilidade, abortamentos, natimortalidade, nascimento de animais prematuros ou ainda animais sem sintomas, mas infectados e portadores renais. Em gado leiteiro, pode ocorrer a diminuição na produção, ocasionada pelo sorovar Hardjo, devido à mastite flácida com agalaxia e pequena quantidade de sangue no leite, o qual adquire aspecto de colostro, amarelado, com grumos grosseiros e elevada contagem de células somáticas. (FAINE et al., 1999).

As leptospiros patogênicas invadem os tecidos do hospedeiro através da penetração da pele lesada ou mucosas da boca, narinas e olhos, podendo também atravessar a pele íntegra quando imersa em água por longo tempo. Espalham-se no organismo pela corrente sanguínea

e instalam-se, principalmente, no fígado e rins, onde produzem hemorragia e necrose tecidual, resultando na disfunção desses órgãos (FAINE et al., 1999; VINETZ, 2001).

As manifestações clínicas da leptospirose humana podem ocorrer de forma muito variável, desde quadros assintomáticos e subclínicos até casos graves potencialmente letais. A maioria dos casos observados apresenta-se sob a forma leve ou moderada, cujas manifestações clínicas podem ocorrer em duas fases distintas. Na fase aguda, caracterizada pela presença da bactéria no sangue (leptospiremia) o paciente pode apresentar febre alta, dores de cabeça e mialgias, com duração dos sinais em torno de uma semana. A seguir, pode ocorrer um período com aparente melhora. Posteriormente, a fase imune inicia-se com o retorno do estado febril, produção de anticorpos aglutinantes e eliminação de leptospiros pela urina. Em aproximadamente 15% dos pacientes, observa-se uma progressão para a forma grave da leptospirose (doença de Weil) que raramente apresenta-se bifásica. Inicia-se com sintomas bastante intensos, como dor nas panturrilhas e febre e evolui para doença icterica com insuficiência renal e hemorragia pulmonar, podendo chegar a 40% de letalidade (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001; VINETZ, 2001).

De Brito et al. (1965) demonstraram que as alterações na membrana são os primeiros elementos da lesão celular. Acredita-se que toxinas circulantes seriam responsáveis pela vasculite capilar que pode causar a hemorragia pulmonar (DE BRITO, 1968; LUKS et al., 2003). Sabe-se que o tecido pulmonar, quando comparado com outros tecidos acometidos pela doença como fígado, apresenta números baixos de leptospiros, indicando que as alterações pulmonares podem estar relacionadas à exposição de toxinas circulantes produzidas pelo patógeno em sítios distantes, tais como o fígado (BHARTI et al., 2003). Os resultados são consistentes com trabalhos anteriores que sugerem a hipótese de que toxinas circulantes estão envolvidas no mecanismo de patogenicidade da leptospirose (AREAN et al., 1963; MILLER et al., 1974).

Além disso, tem-se verificado um aumento de casos de pacientes com comprometimento pulmonar, nos últimos anos, com surgimento de hemoptise e síndrome da angústia respiratória aguda, ou ambas as condições associadas devido a hemorragias. O envolvimento pulmonar tornou-se a principal causa de morte por leptospirose no país (DOLHNIKOFF et al., 2007; GONÇALVES et al., 1992).

Acredita-se que o quadro sintomático variável da leptospirose possa estar diretamente relacionado aos mecanismos envolvidos na colonização, que podem ser decorrentes da presença da leptospira no organismo, pois existem evidências de que a quantidade de leptospiros que penetra o organismo é determinante na gravidade dos sintomas (FAINE et al.,

1999), ou ainda, devido a resposta imune do hospedeiro contra a infecção, mostrando que a susceptibilidade do organismo possa interferir na progressão da doença (KO et al., 2009; LEVETT, 2001; VINETZ, 2001).

Os animais domésticos e de criação mais comumente acometidos são cães, bovinos, suínos e equinos. As manifestações da leptospirose canina são septicemia com um quadro de febre, icterícia, vômitos, diarreia e distúrbio de coagulação intravascular disseminada e comprometimento hepático e renal podendo levar o animal a morte (BOLIN, 1996). Em bovinos e suínos, a doença séptica é mais comum em animais jovens, enquanto os problemas reprodutivos são os mais frequentemente observados em fêmeas adultas. A uveíte recidivante é a ocorrência mais comum em equinos (FAINE et al., 1999).

Os mecanismos imunes contra a leptospirose ainda não são completamente conhecidos. Sabe-se que a imunidade contra a infecção no momento inicial da doença é dependente da resposta humoral, principalmente associada à resposta ao LPS (lipopolissacarídeo) da membrana (ADLER; FAINE, 1978), porém como as leptospirosas são patógenos altamente invasivos, a ativação dos componentes celulares da resposta imunológica também deve ser considerada (PALANIAPPAN, 2006).

Dados da literatura mostraram que as leptospirosas poderiam ter uma fase intracelular rápida, durante a translocação através das monocamadas celulares, o que poderia ser um mecanismo de evasão do sistema imune e também facilitaria a entrada e saída da corrente sanguínea para infectar órgãos-alvo. A presença de leptospirosas no citoplasma de macrófagos, monócitos e células Vero foi observada *in vitro*. Apesar disso, não existem evidências que estas bactérias sejam capazes de se multiplicarem no interior das células hospedeiras, o que sugere que as leptospirosas sejam bactérias invasivas, mas não intracelulares facultativas (BAROCCHI et al., 2012; MERIEN et al., 1997).

A doença pode ser confirmada por meio de testes sorológicos como o Teste de Aglutinação Microscópica (MAT), técnica de referência indicada pela Organização Mundial da Saúde para leptospirose humana ou animal, que emprega suspensões de leptospirosas vivas como antígeno (LEVETT, 2001, 2003). O problema está na demora de até duas semanas para confirmar o diagnóstico clínico da doença por este método, já que os anticorpos séricos só podem ser detectados entre oito e dez dias após a infecção (LEVETT, 2003). Além do diagnóstico tardio o MAT também pode apresentar inespecificidade gerada por reações cruzadas entre sorovares.

O método que permite o diagnóstico definitivo da leptospirose é o isolamento do microrganismo. Este procedimento propicia a identificação do sorovar infectante com

possibilidade de estudos epidemiológicos e profiláticos (FAINE et al., 1999; VASCONCELLOS, 1987). Entretanto, as técnicas de isolamento também são demoradas, além de trabalhosas e restritas a poucos laboratórios de referência.

O tratamento do paciente com leptospirose é feito com antibioticoterapia (doxiciclina e penicilinas) que reduz as chances de evolução para a forma grave. As pessoas com leptospirose sem icterícia podem ser tratadas em casa, enquanto as que desenvolvem as formas graves da doença necessitam de internação com tratamento intensivo (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2003).

Como o diagnóstico é difícil e o tratamento consequentemente acaba sendo tardio, o controle da leptospirose tem sido realizado através do controle de roedores e da melhoria das condições de moradia e saneamento básico para a população, mas tais medidas, embora extremamente importantes, demandam tempo e não são aplicadas a curto e médio prazo. Esta realidade vem favorecendo um aumento da incidência da leptospirose, principalmente da forma grave e a crescente necessidade de desenvolvimento de uma vacina eficiente contra a doença (FAINE et al., 1999).

As vacinas comerciais disponíveis até o momento consistem em preparações de culturas de leptospiros de diferentes sorovares inativadas pela ação do calor e/ou formol (bacterinas). São amplamente usadas na pecuária e licenciadas para uso humano somente em Cuba, Rússia, China e Argentina. Todas apresentam baixa eficiência, pois promovem proteção usualmente contra os sorovares presentes na preparação e falham em induzir imunidade de longa duração, o que requer administração anual ou semestral (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999). Além disso, contêm uma série de contaminantes provenientes do processo de produção, como componentes do meio e LPS, que têm sido associados aos efeitos adversos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; LEVETT, 2001).

Como alternativa, tem sido proposto o desenvolvimento de uma vacina que possa apresentar proteção prolongada contra os diferentes sorovares patogênicos. Sonrier et al. (2000) demonstraram que extratos proteicos de *L. interrogans* foram capazes de induzir proteção contra diferentes sorovares, enquanto frações de LPS conferiram proteção apenas contra os sorovares presentes na preparação.

Neste sentido, vários estudos estão sendo realizados na busca de possíveis candidatos vacinais; como proteínas de membrana externa, lipoproteínas, proteínas envolvidas na motilidade, toxinas, fatores de virulência, entre outros (WANG et al., 2007). Dados experimentais têm mostrado que a patogenia pode estar relacionada com a capacidade destas bactérias em aderir a proteínas de matriz extracelular (ATZINGEN et al., 2008; BARBOSA et

al., 2006; MERIEN et al., 2000), de escapar dos mecanismos de defesa apresentados pelo hospedeiro, como o sistema fagocitário e o complemento (BARBOSA et al., 2009; BARBOSA et al., 2010; CINCO; BANFI, 1983; CINCO et al., 2002; VERMA et al., 2006) e de produzir toxinas (DOLHNIKOFF et al., 2007).

Recentemente, foram sequenciados seis genomas de *Leptospira* spp, sendo de dois sorovares de *L. interrogans* (sorovares Lai e Copenhageni) (NASCIMENTO et al., 2004a, b; REN et al., 2003), de duas estirpes de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis (L550 e JB197) (BULACH et al., 2006) e de duas estirpes da espécie saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc I (Paris e Ames) (PICARDEAU et al., 2008).

As análises computacionais destas sequências têm contribuído para a identificação de genes que codificam proteínas possivelmente envolvidas na patogênese da doença, na virulência e na interação patógeno-hospedeiro. Como por exemplo, nos genomas dos sorovares Lai e Copenhageni foram encontrados mais de 50 genes relacionados com motilidade e resposta quimiotática, cujas proteínas devem permitir a penetração das leptospiros nos tecidos dos hospedeiros durante a infecção (NASCIMENTO et al., 2004a; REN et al., 2003). Por outro lado, muitas sequências gênicas analisadas codificam para proteínas hipotéticas, sem identidade com quaisquer outras proteínas registradas nos bancos de dados, cuja identificação está baseada na análise *in silico* e apenas experimentalmente pode-se comprovar sua existência.

Dados obtidos de proteomas publicados de *L. interrogans* têm confirmado a predição teórica de muitas proteínas. Eshghi et al. (2009) compararam proteomas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni em cultivo convencional e em condições que mimetizavam a infecção (limitação de ferro e presença de soro) e identificaram 563 proteínas, sendo 65 com expressão alterada nas condições limitantes. Análises de proteomas de leptospiros patogênicos e saprófita permitiram a confirmação de várias proteínas anotadas nos respectivos genomas e revelaram a expressão de 33 proteínas somente nos sorovares patogênicos (THONGBOONKERD et al., 2009). Estes resultados demonstram que a análise proteômica é uma etapa essencial à comprovação dos dados do genoma de um organismo, pois fornece não apenas uma lista de proteínas, mas também dados de expressão sob condições definidas e a localização dessas proteínas na célula (CASH, 1998).

Até o momento, não há registro na literatura da identificação de proteínas secretadas por leptospiros através da análise proteômica, apesar da predição, por ferramentas de bioinformática, de várias proteínas secretadas e da existência de genes homólogos de alguns

sistemas de transporte conhecidos em outras bactérias (BULACH et al, 2006; NASCIMENTO et al., 2004a, b; PICARDEAU et al., 2008; REN et al., 2003).

Em bactérias Gram-negativas, o termo secreção refere-se ao transporte ativo de proteínas do citoplasma através das membranas interna, do periplasma e da membrana externa até o meio externo ou superfície da célula. São conhecidos sete sistemas de secreção de proteínas, os do tipo I, III, IV e VI que transportam proteínas em um único passo sem intermediários periplasmáticos; e os sistemas II, V e VII que translocam proteínas, primeiro para o espaço periplasmático através das vias Sec ou Tat-dependentes e depois pela membrana externa (Figura 01). Adicionalmente, os sistemas de secreção II, IV e VI são capazes de transferir proteínas bacterianas diretamente para o interior da célula eucariótica (TSENG et al., 2009).

Figura 1 - Resumo dos sistemas de secreção descritos em bactérias

Fonte: Tseng et al., 2009

Estes sistemas são complexos, muitas vezes, formados por várias proteínas, originando maquinarias de troca entre o ambiente intracelular e o meio extracelular (WAKSMAN et al., 2009).

As proteínas secretadas podem apresentar inúmeras funções em diferentes processos biológicos como aquisição de nutrientes, motilidade e comunicação intracelular, além de participar no processo de colonização do organismo hospedeiro através da secreção de toxinas, adesinas, enzimas degradativas entre outras (WAKSMAN et al., 2009).

O sistema de secreção do tipo I é formado por três componentes; um transportador do tipo ABC, com um domínio de ligação ao ATP, localizado na membrana citoplasmática; uma proteína de membrana externa (OMP) e uma proteína de fusão ou adaptadora (MFP) composta por um domínio pequeno localizado na membrana citoplasmática e um domínio maior periplasmático (DELEPELAIRE, 2004).

Esta maquinaria permite a secreção de proteínas de diferentes tamanhos (20-900 kDa) do citoplasma para o meio extracelular numa única etapa. A maioria das proteínas secretadas por este sistema possui uma sequência sinal não clivável localizada na porção carboxi terminal. A proteína ABC reconhece esta sequência sinal e inicia a montagem do complexo de secreção através da interação específica dos componentes ABC, MFP e OMP com o substrato. A proteína MFP estabelece a ligação entre os componentes das membranas interna e externa, no espaço periplasmático, o que permite a passagem da proteína até o meio extracelular (DELEPELAIRE, 2004; TSENG et al., 2009).

Estão descritas na literatura, várias proteínas secretadas por este sistema, que possuem funções variadas; são proteases, fosfatases, glucanases, nucleases, lipases e toxinas, como a hemolisina A (HlyA) de *Escherichia coli* uropatogênica (GOEBEL; HEDGPETH, 1982), as metaloproteases (PrtA, PrtB) de *Erwinia chrysanthemi* (WANDERSMAN et al., 1987) e a Lipase (LipA) de *Serratia marcescens* (OMORI et al., 2001).

Muitas destas proteínas possuem repetições ricas em glicina (GGXGXDXXX) que se ligam a íons de cálcio, cuja função é desconhecida. Vários estudos tem demonstrado que estas repetições são necessárias para a secreção e para atividade específica da proteína secretada. Por outro lado, algumas proteínas secretadas pelo sistema tipo I não possuem repetições, enquanto outras contêm diferentes tipos de sequências repetidas que também são ligantes a cálcio (BAUMANN et al., 1993; DELEPELAIRE, 2004).

Nos sistemas de secreção do tipo II e V, as proteínas são transportadas em duas etapas diferentes, primeiro para o periplasma pelas vias dependentes das proteínas Sec ou Tat e posteriormente, do periplasma até o ambiente externo, através da membrana externa (TSENG et al., 2009).

As proteínas transportadas pelo sistema dependente de Sec são traduzidas como pré-proteínas e possuem uma sequência sinal amino terminal hidrofóbico e clivável pela ação de peptidases durante a translocação através da membrana interna. Por outro lado, as sequências sinais de secreção das proteínas maduras através da membrana externa permanecem desconhecidas (LINDEBERG et al., 1998; PAPANIKOU et al., 2007).

Uma das proteínas citoplasmáticas SRP (*sinal recognition participle*) ou a chaperona SecB reconhece e liga-se à pré-proteína recém traduzida. O complexo proteico formado é enviado para a membrana interna onde interage com as translocases SecY, SecE e SecE que formam um canal condutor. Posteriormente, proteína SecA reconhece o complexo proteico SecYEG-substrato formado e fornece a energia necessária para sua translocação para o periplasma, onde o peptídeo sinal é clivado por peptidases (PAPANIKOU et al., 2007).

As proteínas transportadas pelo sistema dependente de Tat (*Twin-arginine Translocator*) possuem um motivo rico em resíduos básicos (S-R-R-X-F-L-K) na região amino terminal (CLINE; MCCAFFERY, 2007). Este sistema é geralmente composto por 3 tipos de proteínas: TatA, TatB e TatC que formam dois complexos, um constituído pela proteína TatA (módulo transportador) e outro formado pelas proteínas TatB e TatC (módulo de reconhecimento). Quando os substratos Tat não estão presentes, os dois módulos proteicos encontram-se separados na membrana interna. Na presença de proteínas com motivo rico em resíduos básicos no peptídeo sinal ocorre o reconhecimento pelo complexo TatBC e a associação com o complexo TatA. O substrato é transportado do citoplasma para o periplasma através do canal formado pelas proteínas TatA, posteriormente os dois complexos se dissociam novamente (BUCK et al., 2008).

As proteínas transportadas para o periplasma pelas vias dependentes de Sec ou Tat podem ser secretadas ao ambiente externo pelo sistema do tipo II ou pelo sistema do tipo V (TSENG et al., 2009).

O sistema de secreção do tipo II, chamado sec dependente é responsável pela translocação das pré-proteínas do ambiente periplasmático para o ambiente externo formado por uma estrutura central composta por 12 proteínas, uma ATPase citoplasmática, uma secretina de membrana externa, pseudopilinas e várias proteínas envolvidas na montagem e no reconhecimento do substrato, este sistema é altamente conservado em bactérias Gram negativas, principalmente em patógenos bacterianos onde esta maquinaria é o principal fator de virulência (CIANCIOTTO, 2005).

Existe uma grande variedade de enzimas degradativas secretadas por este sistema, como acetiltransferase, amilases, quitanases, celulasas, liases de pectina, proteases, lipases, phospholipases A e C, nucleases entre outras, muitas envolvidas com a colonização e invasão dos tecidos do hospedeiro (CIANCIOTTO, 2005). Como modelo de proteína secretada neste sistema, Poquet e colaboradores (1993) citam a lipoproteína pululanase A de *Klebsiella oxytoca*, além da toxina termolábil secretada por *Escherichia coli* enterotoxigênica, a toxina da cólera de *Vibrio cholerae* e a toxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (CIANCIOTTO, 2005).

O sistema tipo V é composto por três domínios: o peptídeo sinal, o domínio de passagem e a unidade de translocação em forma de barril tipo β (DESVAUX et al., 2004; HENDERSON et al., 2004). Estas regiões podem fazer parte de uma única proteína que é capaz de translocar os substratos através da membrana externa sem a ajuda de proteínas

acessórias (autotransporte) ou apresentar os domínios de passagem e o domínio β em proteínas diferentes (sistema de secreção em dois componentes).

A maquinaria de secreção do tipo V é responsável pelo transporte de uma grande variedade de proteínas como proteases, adesinas e invasinas (HENDERSON et al., 2004; THANASSI; HULTGREN, 2000). Entre elas, a família de proteases IgA de *Neisseria meningitidis* (MULKS; PLAUT, 1976), uma adesina envolvida na aderência difusa (AIDA)-I de *Escherichia coli* (BENZ; SCHMIDT, 1989) e a pertactina de *Bordetella pertussis* (LEININGER et al., 1991) já foram descritas. O modelo mais estudado de proteína secretada por este sistema é a adesina YadA de *Yersinia* spp, que se liga a componentes de matriz extracelular como colágeno, fibronectina, laminina, além de participar da internalização do patógeno (ROGGENKAMP et al., 2003).

O sistema do tipo III é utilizado pelas bactérias Gram-negativas para a transferência de proteínas efetoras diretamente para o citosol ou para a face citoplasmática da membrana da célula hospedeira. O aparato de secreção é constituído por várias proteínas que formam um canal através do qual os substratos são transportados. Este processo é acionado após a adesão do patógeno à célula do hospedeiro e é essencial para a patogenicidade de muitas bactérias (CORNELIS, 2006).

Atualmente, existem descritas mais de 100 proteínas efetoras presentes em bactérias como *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* enteropatogênica, *E. coli* enterohemorrágica, ou *Pseudomonas* spp., que utilizam o sistema tipo III para injetar fatores de virulência, como proteínas efetoras, no citosol das suas células hospedeiras eucarióticas. Estas proteínas modulam as funções da célula eucariótica (MOTA; CORNELIS, 2005), redirecionando as funções celulares para otimizar o ambiente inter e intracelular, alterando as respostas de defesa do hospedeiro, facilitando o crescimento e a disseminação do patógeno (GALAN; COLLMER, 1999).

Ao contrário da grande diversidade observada entre as proteínas efetoras, as proteínas que formam o sistema do tipo III propriamente dito são conservadas e codificadas por genes que se encontram em ilhas de patogenicidade ou em plasmídeos. Análises filogenéticas mostraram que este sistema é homólogo aos sistemas utilizados para a translocação de proteínas do flagelo bacteriano. As árvores evolucionárias de bactérias e do sistema do tipo III obtidas são completamente diferentes indicando que os genes que codificam as proteínas do sistema do tipo III foram distribuídos horizontalmente entre as bactérias e tardiamente durante a evolução (GOPHNA et al., 2003).

O aparato de secreção do tipo III é constituído por uma estrutura em forma de agulha e por dois anéis que formam um caminho contínuo entre as membranas interna e externa. O anel ligado à membrana externa está associado à agulha que atravessa a membrana externa, fazendo o contato com a célula hospedeira (CORNELIS, 2006).

A montagem e o funcionamento desta maquinaria dependem da assistência de uma série de pequenas proteínas chaperonas citossólicas. Existem três diferentes classes de chaperonas, as de classe I que guiam as proteínas efetoras para a face citoplasmática do aparato através de um processo dependente de ATP; as da classe II que participam da montagem do poro e as da classe III que se ligam às subunidades do complexo de agulha impedindo a polimerização prematura (BENNETT; HUGHES 2000; BIRTALAN; GHOSH, 2001; TSENG et al., 2009).

Os mecanismos de reconhecimento e direcionamento de proteínas secretadas pelo tipo III, até agora, não são bem compreendidos. Várias hipóteses são discutidas, incluindo a participação de um sinal baseado em mRNA, um processo mediado por chaperonas ou a presença de um peptídeo sinal amino terminal. Análises da composição de aminoácidos e da estrutura da região amino terminal de proteínas efetoras experimentalmente confirmadas demonstraram que esta região pode conter uma sequência sinal, entretanto altamente variável na sequência e em alguns casos tolerante de mutações. Adicionalmente, alguns efetores contêm um domínio de ligação a chaperona (ARNOLD et al., 2009; MCDERMOTT et al., 2011; SAMUDRALA et al., 2009).

O sistema do tipo IV é a maquinaria de secreção mais versátil entre os sistemas descritos, pois, além de proteínas, também é capaz de transportar DNA e complexos de proteína e DNA para o interior de células bacterianas e eucarióticas. Devido à sua variedade pode ser classificado em três subfamílias. A subfamília dos sistemas de conjugação que são responsáveis pela transferência de DNA entre bactérias e podendo, em alguns casos, transferir DNA para células eucarióticas (CHRISTIE et al., 2005). A segunda subfamília corresponde ao sistema de transporte de proteínas para as células-alvo. É utilizada por muitas bactérias patogênicas para transferir proteínas efetoras no interior das células hospedeiras. A última subfamília é o sistema de absorção e liberação de DNA do meio extracelular. Destas três subfamílias, aquela capaz de transportar DNA é a única cujo funcionamento é independente do contato com a célula alvo (CASCALES; CHRISTIE, 2003).

O aparato de secreção do tipo IV é estruturalmente complexo, sendo composto por um canal que atravessa a membrana citoplasmática, o espaço periplasmático e a membrana externa. Este canal é formado por subunidades de proteínas e, frequentemente, pode estar

presente um *pilus* externo, que tem a função de adesão à célula alvo (CHRISTIE et al., 2005; TSENG et al., 2009).

Os substratos proteicos secretados pelo sistema do tipo IV contêm clusters de resíduos positivamente carregados em suas porções carboxi terminais. Análises de mutações em regiões contendo resíduos de arginina, lisina e histidina e motivos de Arg-X-Arg têm confirmado a importância da presença destes aminoácidos carregados na secreção (CHRISTIE et al., 2005)

Esta maquinaria está presente em organismos extracelulares como *Bordetella pertussis*, responsável pela coqueluche em crianças, *Helicobacter pylori*, responsável por úlceras gástricas e câncer de estômago, e em patógenos intracelulares como a *Legionella pneumophila* e *Brucella sp.* (CASCALES; CHRISTIE, 2003). Como exemplo de proteínas secretadas por esta via, a proteína CagA secretada por *H. pylori* apresenta ambas as formas fosforilada e não fosforilada que altera as atividades de um grande número de fatores celulares no organismo do paciente.

O sistema tipo VI apresenta uma maquinaria de secreção análoga ao sistemas do tipo III e IV na transferência de proteínas bacterianas diretamente no interior da célula eucariótica. É composto por uma proteína chaperona com atividade ATPásica, um canal entre as membrana interna e externa e uma estrutura em forma de agulha. De maneira geral, a identidade e as funções das proteínas efetoras não são bem compreendidas (TSENG et al., 2009). Trabalhos têm mostrado que as proteínas secretadas por este sistema não possuem uma sequência sinal característica na região amino terminal (CASCALES, 2008; SHRIVASTAVA et al., 2008)

Proteínas secretadas por este sistema foram descritas em organismos patogênicos como *Burkholderia mallei*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholera* e *Edwardsiella tarda* (BRÖMS et al., 2012).

Na virulência de organismos patogênicos, tais como, *Vibrio cholera* e *Edwardsiella tarda*, as proteínas secretadas pelo sistema tipo VI são essenciais nas funções como *quorum sensing*, respostas ao *stress*, a formação de biofilme, simbiose, fagocitose e atividades anti-bacterianas.

O sistema de secreção do tipo VII foi descrito recentemente em micobactérias, que são Gram-positivas e possuem uma parede celular que é fortemente modificada por lípidos. Informações sobre a estrutura e funcionamento ainda não estão disponíveis. Estudos têm sugerido a existência de uma proteína chaperona com atividade ATPásica ancorada na

membrana interna e um canal formado por uma proteína integral (ABDALLAH et al., 2007). Até o momento, não existem registros deste sistema em bactérias Gram-negativas.

Além destes sistemas clássicos amplamente estudados existe descrito o termo “secreção não clássica” o qual foi proposto por Bendsten et al. (2005a) para designar proteínas que são secretadas sem sequências sinal aparentes. O mecanismo de secreção deste sistema ainda não é conhecido, e não se sabe se existe apenas um ou vários sistemas de secreção envolvidos. A única característica em comum é a presença extracelular destas proteínas e a falta de um peptídeo sinal. Sabe-se que algumas proteínas, que possuem função citoplasmática possuem também função extracelular e muitas vezes diferente, estas proteínas têm sido denominadas proteínas *moonlighting*. Estas proteínas são capazes de desempenhar funções adicionais não relacionadas ao seu papel metabólico descrito (JEFFERY, 1999). Um exemplo é a enolase de *Streptococcus pneumoniae*, cuja função primária é catalisar a conversão de fosfoglicerato em fosfopituvato na glicólise, podendo desempenhar funções *moonlighting* na interação patógeno-hospedeiro, pois também está localizada na superfície celular e capaz de se ligar ao plasminogênio (BERGMANN et al., 2001).

A secreção de proteínas para o ambiente extracelular é uma característica importante de patógenos microbianos, pois as proteínas extracelulares podem mediar interações com as células do hospedeiro durante a infecção. Na leptospirose grave, o dano na parede dos vasos capilares é a principal lesão observada e está relacionada com a hemorragia pulmonar, muitas vezes fatal. O tecido pulmonar de pacientes apresenta, normalmente, uma quantidade pequena de bactérias, sugerindo que os efeitos pulmonares ocorram pela exposição a toxinas circulantes produzidas pelo patógeno em sítios distantes como fígado e rins (DOLHNIKOFF et al., 2007). Além disso, a disseminação das leptospiros pelos órgãos do hospedeiro é mediada, provavelmente, pela secreção de enzimas capazes de destruir as membranas das células (BRANGER et al., 2001; CARVALHO et al., 2009). Nos genomas das leptospiros patogênicas estão presentes genes que codificam hemolisinas, fosfolipase D e proteases (como collagenases, metaloproteases e termolisinas), que poderiam participar destes eventos (BULACH et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2004a, b; REN et al., 2003). É importante mencionar que, apesar da observação da presença proteolítica em leptospiros, não existem dados na literatura que correlacionem esta atividade enzimática com os mecanismos de invasão da bactéria no hospedeiro e a instalação da patologia.

Neste contexto, espera-se que a identificação das proteínas secretadas por *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm (patogênica) e pela *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica), através de análise proteômica, possa contribuir na

elucidação dos mecanismos envolvidos na patogênese, possibilitando o entendimento dos aspectos relacionados ao tratamento e à prevenção da leptospirose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste projeto é a identificação de proteínas secretadas por *Leptospira interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm (patogênica) e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica) através de análise proteômica.

2.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer um protocolo para a obtenção de proteínas secretadas de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm (patogênica) e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica).
2. Obter perfis bidimensionais dos extratos de proteínas extracelulares de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc e identificar as proteínas utilizando espectrometria de massas.
3. Obter amostras complexas em solução dos extratos de proteínas extracelulares de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc e identificar as proteínas utilizando espectrometria de massas.
4. Identificar as proteínas secretadas através de análise *in silico*, utilizando ferramentas de Bioinformática.
5. Realizar análise comparativa entre as proteínas identificadas *in silico* e experimentalmente por espectrometria de massas.
6. Identificar a presença de atividade proteolítica nos extratos de proteínas extracelulares de *L. interrogans* e *L. biflexa* utilizando substratos sintéticos e inibidores específicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estirpes bacterianas

As leptospiros utilizadas neste trabalho foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório do Dr. Silvio de Arruda Vasconcellos, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

A espécie não-patogênica, *Leptospira biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (PATOC) e a espécie patogênica, *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm (LPF) foram cultivadas em meio EMJH modificado (Ellinghausen-McCoulough-Johnson-Harris) constituído por meio EMJH base (Difco™ Laboratories, Sparks, Maryland, EUA) (0,23%) suplementado com 1-10% de soro de coelho inativado; 0,015% L-asparagina; 0,0015% piruvato de sódio; 0,001% CaCl₂; 0,001% MgCl₂; 0,03% peptona e 0,02% extrato de carne (ALVES et al., 1996) ou em meio EMJH completo composto por EMJH base (0,23%) enriquecido com 10% albumina bovina, 1,25 % Tween 80, vários sais minerais e vitaminas, cuja composição completa encontra-se descrita em Haake (2000).

Para o isolamento de leptospiros a partir do macerado dos rins de animais infectados utilizou-se meio semi-sólido de Fletcher (Difco). A cultura foi mantida a uma temperatura de 29 °C sem agitação. O crescimento bacteriano foi monitorado em microscópio de campo escuro e a contagem celular foi realizada em câmara de *Petroff-Hausser*.

A fim de garantir a virulência da estirpe bacteriana patogênica, esta foi mantida através da passagem em hamsters experimentalmente infectados segundo protocolo descrito em Faine et al. (1999) e mantidas no máximo até terceira passagem *in vitro*.

As condições de cultivo, como temperatura (29 °C ou 37 °C), tempo (5 horas de secreção) e componentes do meio (enriquecimento com soro de coelho ou albumina sérica bovina), foram otimizadas para possibilitar a obtenção de quantidades adequadas de proteínas secretadas e mimetizar as situações *in vivo* conforme descrito no item Resultados.

3.2 Obtenção das proteínas secretadas.

Para a obtenção das proteínas secretadas, vários protocolos foram testados, conforme descrito no item Resultados, chegando-se a um procedimento adequado que será descrito a seguir e está esquematizado na Figura 6. Cultivou-se em meio EMJH modificado com soro de coelho e enriquecido com BSA, alíquotas de 20 mL das duas espécies de leptospira, estas

foram transferidas para um Erlemeyer contendo 180 ml de meio de cultivo, seguindo a mesma proporção preconizada entre cultura e meio (1:10) para obtenção de 200 mL de cultura bacteriana a qual foi mantida até atingirem $1-2,5 \times 10^8$ células/ml contadas em câmara de Petroff-Hausser em microscópio de campo escuro, aproximadamente 7 dias, em condição de cultivo anteriormente descrita. As culturas foram centrifugadas ($5.5000 \times g$, 20°C , 25 min), o sobrenadante descartado e o sedimento bacteriano ressuspendido cuidadosamente em solução PBS estéril, este procedimento foi repetido por mais duas vezes, a fim de eliminar os resíduos provenientes do meio de cultura.

Posteriormente, cada sedimento bacteriano foi ressuspendido em um volume de 20 ml de solução de PBS estéril o qual foi mantido durante 5 horas à 29°C (*L. biflexa*) ou 37°C (*L. interrogans*) para secreção das proteínas, com agitação manual suave a cada hora. As amostras após este período para secreção das proteínas foram centrifugadas ($9.000 \times g$, 4°C , 30 min) e filtradas ($0,22 \mu\text{m}$) para remoção das células residuais.

Os sedimentos bacterianos foram armazenados a -80°C , sendo o sobrenadante dialisado por cinco vezes (membrana de diálise 3.5 kDa) contra dois litros de Tris-HCl 0,1 mM pH 8,8, para remoção do excesso de sal conferido pela solução de PBS para a obtenção do extrato a ser aplicado no gel bidimensional ou dialisado contra PBS 100X diluído para a análise em solução. Cada diálise foi realizada por pelo menos 5 horas, a 5°C . A amostra dialisada foi liofilizada a fim de obter-se o extrato proteico concentrado 100X.

3.3 Eletroforese unidimensional

Os géis utilizados possuíam 1,0 mm de espessura, 5% de bisacrilamida/acrilamida no gel de empilhamento e 15% de bisacrilamida/acrilamida no gel de separação (a partir de uma solução de 29% Acrilamida e 1% Bisacrilamida). As eletroforeses foram feitas a 8 V/cm de gel de empilhamento e 15 V/cm de gel de separação, a temperatura ambiente. Os géis foram posteriormente corados com “Coomassie Blue Brilliant R-250” (USB, Cleveland, OH, EUA) em 50% etanol e 10% ácido acético em água por 1-2 horas a temperatura ambiente, descorados com solução de 30% etanol e 10% ácido acético em água, envoltos em papel celofane secos ao ar.

3.4 Eletroforese bidimensional

3.4.1 Isoeletrofocalização

Para a separação em primeira dimensão, o precipitado de proteínas secretadas liofilizado foi ressuspendido em 300 µL de tampão de solubilização DeStreak™ Rehydration Solution - GE Healthcare (GE Healthcare Bioscience, AB, EUA) e o material insolúvel foi removido por centrifugação a 12.000 x g por 10 min. Para a reidratação de cada fita de gel (Strip – Imoabile™ DryStrip pH3-10, 13 cm - GE Healthcare) utilizou-se uma alíquota de 250 µL deste sobrenadante adicionado de 6µL (0.2%) de tampão IPG Buffer pH 3-10 (GE Healthcare). A reidratação das fitas de 13 cm de pH 3-10 (GE Healthcare) foi feita por 16 horas à temperatura ambiente em IPGbox (GE Healthcare).

A focalização isoeletrica, para a separação das proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico, foi realizada logo após a reidratação, no sistema Ettan IPGphor III (GE Healthcare), utilizando a programação definida pelo fabricante para a faixa de pH escolhida. As etapas foram as seguintes: (S1) Stp 500 V por 1 h, (S2) Grd 1000 V a 750 Vh, (S3) Grd 8.000 V a 11.250 Vh, (S4) Grd 8000 V a 4.000 Vh, (S5) Stp 200 V a 2.050 Vh, (S6) Stp 100 V por 24 h e (S7) Stp 8.000 V por 30 min.

Posteriormente, os géis IPG foram equilibrados sob agitação por 15 minutos em 10 ml de tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M uréia, 30% glicerol, 0,002% azul de bromofenol) contendo 65 mM Dithiothreitol (DTT- Gibco® by Lifetechnologies™, NY, EUA), para redução das proteínas, em seguida os géis foram tratados, por mais 15 minutos, em 10 ml da mesma solução, substituindo o DTT por 100 mM de iodoacetamida (IAA- Sigma-Aldrich™, St. Louis, EUA) para alquilação das proteínas, sob agitação à temperatura ambiente.

3.4.2 Eletroforese bidimensional SDS-PAGE

Para a separação das proteínas por massa molecular (segunda dimensão), foi realizada a eletroforese bidimensional (2DE) em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a qual foi realizada utilizando-se a cuba Hoefer SE 600 Ruby™ (GE Healthcare), acoplada ao sistema de banho circulante MultiTemp III™ (GE Healthcare), para manter o tampão de corrida a 20°C. Os géis de SDS-PAGE (18 x 16 cm) contendo 12,5% de acrilamida foram feitos segundo o protocolo descrito por Laemmli (1970). As tiras IPG previamente

equilibradas foram cuidadosamente posicionadas na superfície do gel SDS e imobilizadas com 0,5% de agarose e traços de bromofenol. O padrão de massas moleculares Low Molecular Weight (LMW) de 14,4 a 97 kDa (GE Healthcare, Moscou, Rússia) também foi adicionado ao gel. A corrida foi feita com uma corrente inicial de 25 mA/gel, 300 V, 100 W, 20 °C, por 30 min e posteriormente a 35 mA/gel, 600 V, 100 W, 20 °C até o azul de bromofenol atingir o final do gel.

A detecção das proteínas nos géis bidimensionais (2DE-PAGE) foi feita pela impregnação por prata.

O gel foi fixado com 50 % de metanol, 12 % de ácido acético e 37 % de formaldeído por 30 segundos a temperatura médio-alta em forno microondas e 30 min a temperatura ambiente (TA) sob leve agitação; seguido por lavagem em solução 30 % de metanol por 30 segundos a temperatura alta em forno microondas e 5 min (TA) sob leve agitação. Na fase seguinte, os géis foram incubados com solução de 0,02 % de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) por 30 segundos em temperatura alta e 2 min (TA) sob agitação. Em seguida, o gel foi lavado duas vezes com água destilada por 30 segundos em temperatura alta e 2 min (TA) sob agitação. Após as lavagens, esses foram incubados com 0,2 % de nitrato de prata por 30 segundos em temperatura alta e 5 min (TA) sob agitação. Uma última lavagem foi feita com água destilada por 40 segundos em alta temperatura, anteriormente a adição da solução reveladora contendo 0,05 % de formaldeído 37 % e 3 % de carbonato de sódio (Na_2CO_3), até o aparecimento das bandas proteicas (TA), a reação foi interrompida com 12 % de ácido acético em 50 % de metanol.

As imagens dos géis foram digitalizadas em impressora HP com resolução de 300 dpi.

3.4.3 *Espectrometria de massas*

As análises das massas moleculares dos peptídeos foram feitas em espectrômetros de massa gentilmente cedido ao uso pelo Laboratório Nacional de Biosciências (LNBio) do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS- Campinas).

3.4.4 Digestão enzimática de spots proteicos

Os *spots* detectados foram recortados do gel bidimensional e submetidos ao procedimento de descoloração e digestão *in situ*. Para remoção do corante, os *spots* corados por Coomassie Blue foram lavados 4 vezes, por 15 minutos, com 50 mM NH_4HCO_3 contendo 50% de acetonitrila (ACN) sob agitação suave e secos por centrifugação à vácuo *Speed-vac*TM (Eppendorf) por 30 minutos. Para remoção da coloração por prata, foi utilizado 200 μL de solução 1:1 de 30 mM ferrocianato de potássio e 100 mM tiossulfato de sódio.

Em seguida os *spots* foram desidratados por duas vezes com 200 μL ACN 100% por 5 min, intercalando a ACN com a secagem a vácuo em *Speed-vac* por 2 min. Para a redução das proteínas a cada “spot” foi adicionado 30 μL de solução de DTT 10 mM com 50 mM NH_4HCO_3 por 30 min, sob agitação e depois as proteínas foram alquiladas com 30 μL de solução de IA 50 mM com 50 mM NH_4HCO_3 por 30 min, sob agitação, no escuro.

Os *spots* foram lavados com 100 μL de solução de 100 mM NH_4HCO_3 , por 10 min, novamente desidratados com ACN e reidratados com solução de 100 mM NH_4HCO_3 .

Em seguida, cada *spot* foi submetido à hidrólise triptica em 15 μL de uma solução contendo 50 mM NH_4HCO_3 e 3 μg (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) da tripsina modificada Promega (Promega, Madison WI, USA) Após 10 minutos, foram adicionados a cada *spot* 20 μL de 50 mM NH_4HCO_3 , e a reação foi mantida a 37 °C por 18 horas.

Após digestão triptica das proteínas, a solução contendo os peptídeos foi transferida para novos tubos e os géis foram lavados para recuperação do restante dos peptídeos com 10 μL ácido fórmico 5% por 10 min, e posteriormente na segunda lavagem com ácido fórmico 5% e ACN 50%, por 10 min, sendo os sobrenadantes coletados e adicionados à solução retirada anteriormente. O volume final resultante da extração de peptídeos foi concentrado por centrifugação à vácuo *Speed-vac* até completa secagem. As amostras secas foram ressuspensas com 5 μL de ácido fórmico 0.1% (Sigma).

3.4.5 Digestão enzimática de amostras complexas em solução.

A digestão enzimática de amostra em solução foi realizada conforme metodologia descrita pelo grupo de espectrometria de massas, coordenado pela Dr. Adriana Paes Leme, localizado no LNBio (Laboratório Nacional de Biociências) em Campinas-SP (PAES LEME et al.,2012).

As amostras de proteínas secretadas, dialisadas contra PBS 100 vezes diluído e liofilizadas, foram ressuspensas em 40 μL de solução 50 mM NH_4HCO_3 . As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford e padronizadas para uma mesma concentração proteica (26.40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Seguiu-se com os passos de redução e alquilação a partir da adição de 1 μL de DTT 0.2M com 50 mM NH_4HCO_3 , incubando-se por 25 min a 56°C, seguido da adição de 2,8 μL de IA 0.2 M com 50 mM NH_4HCO_3 , mantida abrigado de luz por 30 min. Novamente adicionou-se 1 μL da solução de DTT 0.2M, incubando-se por 15 min no escuro. Em seguida foi adicionado 0.4 μL de solução de CaCl_2 1mM.

Para a hidrólise triptica, a cada amostra foi adicionado 25 μL de tripsina (Tripsina modificada Promega) previamente ressuspensa em 1000 μL de 50 mM NH_4HCO_3 incubando a reação a 37 °C por 18 horas.

A reação foi interrompida quando atingiu pH 2.0 com a adição de ácido fórmico 0.4%. Na sequência todas as amostras foram centrifugadas a 2.500 x g, 10 min, TA. O sobrenadante foi recuperado para outro tubo e concentrado por centrifugação à vácuo *Speed-vac* até completa secagem. As amostras secas foram ressuspensas com 15 μL de ácido fórmico 0.1% (Sigma®).

3.4.6 Obtenção e análise dos espectros de massa dos peptídeos tripticos

Para análise das amostras contendo os peptídeos foi utilizada a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS - *Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*) disponível no Laboratório de Biociências – LNBio – (Campinas), para separação dos peptídeos, determinação de massa molecular e fragmentação para posterior identificação dos fragmentos da proteína precursora.

As amostras foram carregadas no sistema de cromatografia capilar Waters® nanoACQUITY UPLC® System (Waters, Milford, MA) acoplado ao espectrômetro de massa com fonte de ionização eletrospray (ESI) com analisadores de voo em série do tipo Q-Tof Ultima (MicroMass/Waters, Milford, MA).

As proteínas digeridas foram dessalinizadas — *on line* usando a coluna Opti-Pak C18 trap Waters. O volume da amostra injetada foi de 4,5 μL e a cromatografia líquida foi realizada numa coluna de fase reversa Ease C18 (100 μm x 100 mm, Waters, Milford, MA) usando um gradiente linear variando de 0 a 90% de ACN contendo 0, 1% de ácido fórmico durante 20 min sob fluxo de 0,6 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.4.7 Identificação das proteínas em bancos de dados a partir do mapa de peptídeos

A interpretação dos espectros para dedução das sequências dos peptídeos gerados por ESI-Q-Tof (Ultima API[®], Waters), foi feita utilizando-se o *software* Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.-<http://www.matrixscience.com/>), com interpretação de bancos de dados, ajustado com os seguintes parâmetros previamente selecionados: enzima (tripsina), permitir até 1 sítio de clivagem, tolerância das massas dos peptídeos de 0.1 Da, e tolerância de ± 0.1 Da para MS/MS, modificação fixa (*Carbamidomethyl - C*), modificação variável (*Oxidation - M*), carga do peptídeo (1+, 2+ ou 3+), formato dos dados (*Mascot generic*) e instrumento (ESI-QUAD-TOF).

Na pesquisa foram usados os valores de massas monoisotópicas dos espectros MS/MS (MS/MS Ion Search), utilizado dois bancos de dados, para identificação das proteínas NCBI e o próprio banco de dados gerado pelos projetos genomas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 e *Leptospira biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc 1 - Paris. Não existem dados genômicos disponíveis para a estirpe *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm.

3.5 Análises *in silico*

Para a identificação, por predição teórica, das proteínas secretadas foram utilizados os programas: SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>) que detecta a presença de peptídeo sinal; PSORTb 3.0 (<http://www.psort.org/psortb>) que faz a predição da localização celular da proteína; SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP>) que identifica proteínas secretadas pela via não clássica, TatP 1.0 que identifica proteínas secretadas pela via dependente de Tat (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>), além do programa BlastP - *Standard Protein BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para comparação de sequências de proteínas por similaridade e o banco de dados de proteases Merops (<http://merops.sanger.ac.uk/>).

3.6 Ensaio de atividade enzimática

3.6.1 Ensaio Fluorimétrico

A atividade proteolítica dos extratos de proteínas extracelulares de *L. interrogans* e *L. biflexa* foi determinada em tampão PBS, pH 7,4, com a adição de 5,0 μ M dos substratos sintéticos com fluorescência apagada (FRET-Fluorescence Resonance Energy Transfer). O aumento da fluorescência foi monitorada continuamente por 5 min no espectrofluorímetro (Victor^{III}, Perkin Elmer) ajustado com fenda de excitação e emissão de 5 e 5 nm, comprimento de onda de excitação e emissão 320 e 420 nm, respectivamente. A temperatura da reação na cubeta foi mantida a 37 °C em compartimento termoequilibrado e sob agitação (PORTARO et al., 2000).

Inicialmente, o substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp foi utilizado por ser universal e ser passível de hidrólise por várias metaloproteínases (RAWLINGS et al., 2008). Também os substratos Abz-GGFLRRV-EDDnp (análogo à Dinorfina), Abz-LYENKP-EDDnp (análogo a neurotensina) e Abz-GFX₁PFRQ-EDDnp e Abz-GFS X₂FRQ-EDDnp (sequências análogas à bradicinina e prostaglandina, onde X₁ = Ala, Ser e Asp e X₂= Glu, Arg e Phe) foram avaliados junto ao controle negativo (PBS).

Os dados cinéticos foram determinados a partir das velocidades iniciais de hidrólise (consumo de substrato inferior a 10%, cinética de ordem zero) e como se trata de um aumento proporcional ao número de moléculas peptídicas clivadas, o índice de variação de fluorescência da solução é uma medida direta da velocidade de hidrólise que pode ser utilizado para determinação das constantes cinéticas desta interação enzima-substrato. Os cálculos envolvendo os parâmetros cinéticos (K_m , $V_{máx}$ e k_{cat}) foram realizados utilizando a equação descrita por Michaelis-Menten no programa GRAFIT para Windows 3.0 (LEATHERBARROW, 1990).

3.6.2 Ensaio Cromatográfico

A atividade de hidrólise foi observada utilizando um substrato universal (cadeia β da insulina oxidada) que oferece diferentes sítios de clivagem favorecendo uma análise rápida e abrangente de proteases de diferentes naturezas catalíticas.

A solução de cadeia β da insulina foi incubada em tampão PBS pH 7.4 (50 mM fosfato e 20 mM NaCl) com os secretomas de *L. interrogans* e *L. biflexa* a 37 °C sendo mantidos por um período de 30 minutos e 22 horas respectivamente.

As medidas de atividades proteolíticas dos secretomas também foram avaliadas na presença e ausência de inibidores sítio-dirigidos para serinopeptidases e metalopeptidases (3 mM PMSF e 3 mM 1-10 fenantrolina respectivamente). Os inibidores foram pré-incubados

com duas soluções contendo as moléculas secretadas tanto por *L. interrogans*, quanto por *L. biflexa* durante 30 min a temperatura ambiente e após este período, a cadeia β da insulina foi adicionada.

Para análise da atividade foi utilizado o sistema de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Shimadzu Prominence, um sistema binário composto por duas bombas (modelos LC 20AD); um degaseificador, responsável pela retirada de bolhas da fase móvel através de vácuo (modelo DGU 20A3) e um detector de UV (modelo SPD 20A) o qual neste experimento foi apenas utilizado o comprimento de 214 nm para o monitorados.

Nas análises peptídicas, foi utilizada coluna C-18 Nucleosil (15,0 x 4,0 mm) e gradiente de 20% a 60% do Tampão B durante 20 minutos [tampão A (H₂O/ 0,1 TFA) e tampão B (acetonitrila/tampão A 9:1)]. Os picos referentes aos produtos de hidrólises obtidos foram coletados manualmente e submetidos à análise por espectrometria de massas.

As medidas de atividades proteolíticas dos extratos de proteínas secretadas também foram avaliadas na presença de inibidores sítio-dirigidos para serinopeptidases e metalopeptidases.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção do extrato de proteínas secretadas

Um dos maiores desafios ao estudo de secretomas é a dificuldade de obtenção de proteínas secretadas sem contaminação citoplasmática ocasionada pela morte celular. Por esta razão, uma cinética de cultivo foi realizada para a determinação da fase logarítmica da cultura que corresponde ao período mais adequado de coleta dos sobrenadantes, pois deve minimizar a morte celular quando comparado com a fase estacionária.

Para tanto, as estirpes de *L. interrogans* e *L. biflexa* foram cultivadas em meio EMJH enriquecido com 10% de soro de coelho. Na figura 2, é possível observar que o final da fase logarítmica ocorre com oito dias de cultivo. As leptospiros são bactérias de cultivo lento com tempo de duplicação celular de aproximadamente 20 horas (LEVETT, 2001). Dessa forma, foi estabelecido o total de sete dias de cultivo para a coleta dos sobrenadantes com um número de células adequado.

Figura 2 - Cinética de cultivo das estirpes de *L. interrogans* (LPF) e *L. biflexa* (Patoc) em meio EMJH enriquecido com 10% de soro de coelho.

Além da contaminação citoplasmática, deve-se considerar que as etapas de extração de proteínas secretadas a partir de grandes volumes de meios de cultura, ricos em sais, albumina

e outros compostos, frequentemente interferem com a maioria das técnicas proteômicas. Por estas razões, três protocolos diferentes de obtenção de proteínas secretadas foram testados.

No primeiro protocolo, as estirpes de *L. interrogans* e *L. biflexa* foram cultivadas, por sete dias, em meio EMJH enriquecido com 1 de soro de coelho. Os sobrenadantes foram recuperados por centrifugação, filtrados em membrana de 0,22 µm e armazenados a -80 °C até o momento do uso. Antes do congelamento, alíquotas dos sobrenadantes filtrados foram dialisadas contra tampão 0,1 mM Tris-HCl e precipitadas com TCA e acetona. As amostras precipitadas foram ressuspensas num volume de água adequado para estabelecer a concentração de 10 mM Tris-HCl e concentrar 100 vezes o sobrenadante do cultivo. A análise das amostras, em gel SDS-PAGE (Figura 3, poços 1 e 2), demonstrou a presença de grande quantidade de albumina proveniente do soro de coelho do meio de cultura nos sobrenadantes.

Para avaliar a eficiência da remoção da albumina presente na amostra, a cromatografia de troca iônica foi utilizada. Os sobrenadantes dos cultivos das estirpes *L. interrogans* e *L. biflexa* foram descongelados e dialisados contra tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,5 e aplicados à coluna de Q-Sepharose HiTrap™ (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Björkgatan, Uppsala, Suécia), previamente equilibrada com o mesmo tampão. Nesta concentração salina e pH, espera-se que a albumina ligue-se à resina e a maioria das proteínas dos sobrenadantes passem pela coluna. O *flow through* de cada cromatografia foi coletado, dialisado contra tampão 0,1 mM Tris-HCl e precipitado com TCA e acetona. As amostras precipitadas foram ressuspensas num volume de água adequado para estabelecer a concentração de 10 mM Tris-HCl e concentrar 100 vezes a amostra. A albumina foi eluída da resina com 1M de NaCl (Figura 3, poços 5 e 6).

A análise das amostras, em gel SDS-PAGE (Figura 3), mostrou que a cromatografia de troca iônica não excluiu completamente a albumina do sobrenadante, sendo visualizada nas frações do *Flow through* (poços 3 e 4). Além disso, ocorreu a perda de proteínas do sobrenadante durante o processo, como pode ser verificado na comparação dos poços 1 e 2 antes da passagem da coluna com os poços 3 e 4 após a cromatografia, tornando a utilização deste protocolo inviável.

Figura 3 - Análise das amostras do primeiro protocolo de obtenção das proteínas secretadas a partir dos sobrenadantes de *L. interrogans* e *L. biflexa* cultivadas em meio EMJH enriquecido com 1% de soro de coelho, em gel de poliacrilamida (SDS-Page 12%) corado com *Coomassie Brilliant Blue*.

M – Padrão de baixo peso molecular (LMW); 1- Sobrenadante de *L. biflexa*; 2- Sobrenadante de *L. interrogans*; ambos concentrados 100X antes da cromatografia; 3- Flow through de *L. interrogans*; 4- Flow through de *L. biflexa*; 5- Albumina eluída da cromatografia do sobrenadante de *L. interrogans*; 6- Albumina eluída da cromatografia do sobrenadante de *L. Biflexa*.

No segundo protocolo de obtenção de proteínas secretadas testado, as estirpes *L. interrogans* e *L. Biflexa* foram cultivadas por sete dias em meio EMJH enriquecido com 10% de soro de coelho. As culturas obtidas foram centrifugadas, os sobrenadantes descartados e os sedimentos bacterianos lavados duas vezes em PBS para eliminar os contaminantes provenientes do meio de cultura.

Posteriormente, os sedimentos bacterianos lavados foram ressuspensos em PBS estéril em 1:10 do volume da cultura inicial. As suspensões bacterianas foram mantidas durante 5 horas a 37 °C para a *L.interrogans* e 29 °C para a *L.biflexa* para secreção das proteínas, com agitação manual suave a cada hora. Após este período, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes foram filtrados em membrana de 0,22 µm para remoção das células residuais. Os extratos de proteínas secretadas foram dialisados contra tampão PBS 100 vezes diluído e precipitados com TCA e acetona. As amostras precipitadas foram ressuspensas num volume de água adequado para reconstituir a concentração do PBS e concentrar 100 vezes e analisados em gel SDS-PAGE. Na figura 4, é possível verificar que o protocolo testado foi eficiente na obtenção de proteínas secretadas. Além disso, o aumento da

temperatura para 37 °C foi utilizado para mimetizar a temperatura do hospedeiro no caso da espécie patogênica e estimular a expressão de proteínas importantes na patogênese, como fatores de virulência. Entretanto, neste protocolo a solubilização do precipitado proteico após a utilização de TCA e acetona mostrou-se um procedimento difícil, por esta razão, dois outros métodos de concentração e dessalinização foram testados.

Figura 4 - Análise das amostras do segundo protocolo de obtenção do extrato de proteínas secretadas a partir dos cultivos de *L. interrogans* e *L. biflexa* em meio EMJH enriquecido com 10% de soro de coelho, em gel de poliacrilamida (SDS-Page 12%) corado com *Coomassie Brilliant Blue*.

M – Padrão de baixo peso molecular (LMW); 1- Extrato de *L. interrogans*; 2- Extrato de *L. biflexa*.

No protocolo 3, os extratos de proteínas secretadas de *L.interrogans* e *L.biflexa* foram obtidos como descrito no protocolo 2. Posteriormente, o extrato de *L.biflexa* foi dialisado contra tampão PBS 100 vezes diluído e liofilizado. O extrato de *L.interrogans* foi dividido em três amostras e cada uma foi testada em um procedimento diferente. Uma das amostras foi concentrada e dessalinizada utilizando-se o sistema de ultrafiltração *Vivaspin*[®] (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Björkgatan, Uppsala, Suécia), outra foi precipitada com TCA e acetona conforme descrito no protocolo 1 e a última amostra foi dialisada contra tampão PBS 100 vezes diluído e liofilizada. As amostras liofilizadas e precipitadas com TCA e acetona foram ressuspensas num volume de água adequado para reconstituir a concentração do PBS

e concentrar 100 vezes. A partir da análise das amostras em gel SDS-PAGE (Figura 5), verificou-se que o procedimento de ultrafiltração é eficiente (poço 3), entretanto com a etapa de centrifugação muito demorada. Sendo assim, optou-se pela diálise seguida de liofilização como o melhor procedimento (poço 1 e 4), pois apresentou um rendimento de proteínas equivalente ao da precipitação com TCA e acetona (poço 2), sem o problema da solubilização.

Os dados obtidos com a análise do gel SDS-PAGE estão de acordo com a quantificação realizada em cada amostra, a qual apresentou para *L. interrogans* (0,85 µg/µl e 0,98 µg/µl) e para *L. biflexa*, (1,25 µg/µl e 1,58 µg/µl) nos experimentos 02 (precipitação com TCA e acetona) e 03 (diálise e liofilização), respectivamente. Dessa forma, a diálise seguida da liofilização foi o escolhido para dessalinizar e concentrar as amostras. Na figura 6, o protocolo final para obtenção das proteínas secretadas por *Leptospiras spp.* está esquematizado com duas variações no meio de cultura EMJH enriquecido com BSA ou Soro de coelho e com aumento da temperatura para 37 °C por 5 h.

Figura 5 - Análise das amostras do terceiro protocolo de obtenção das proteínas secretadas de *L. interrogans* e *L. biflexa* cultivadas em meio EMJH enriquecido com 10 de soro de coelho, em gel de poliacrilamida (SDS-Page 12) corado com *Coomassie Brilliant Blue*

M – Padrão de baixo peso molecular (LMW); 1- Extrato de proteínas extracelulares de *L. biflexa* (liofilizado); 2-Extrato de proteínas extracelulares de *L. interrogans* (TCA/acetona); 3-Extrato de proteínas extracelulares de *L. interrogans* (ultrafiltração); 4- Extrato de proteínas extracelulares de *L. interrogans* (liofilizado)

Figura 6 - Resumo do fluxograma final para obtenção das proteínas secretadas por *Leptospiras* spp.

4.2 Identificação de proteínas secretadas utilizando eletroforese bidimensional e espectrometria de massas

Com o protocolo de obtenção das proteínas secretadas estabelecido, a próxima etapa foi a determinação teórica da faixa de pH e massa molecular das proteínas. Para isso, as sequências de proteínas anotadas nos genomas de *L. interrogans* sorovar copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc 1 - Paris foram analisadas utilizando-se o programa JVirGel V.2.0. Foram utilizados os dados genômicos de *L. interrogans* sorovar copenhageni estirpe Fiocruz L1-130, pois não existem dados genômicos disponíveis para a *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm e estas duas estirpes são da mesma espécie (*L. interrogans*).

Este programa permite a determinação dos pontos isoeletricos (pI) e massas moleculares teóricas e com estes dados desenha um gel bidimensional virtual. Além disso,

possibilita a otimização dos proteomas calculados através da remoção dos peptídeos sinais de proteínas possivelmente secretadas pelo sistema Sec dependente (HILLER et al., 2006). Nas figuras 7 e 8, são mostrados os géis bidimensionais teóricos obtidos. Os pontos marcados em preto correspondem às proteínas totais e os marcados em vermelhos são as prováveis proteínas secretadas pelo sistema Sec dependente, neste último caso, os cálculos de massa e pI são realizados a partir das sequências de aminoácidos das proteínas maduras, sem sequência sinal. A maioria das proteínas totais e secretadas apresentou pI teórico entre 3 e 10 e massa molecular entre 15 e 150 kDa. Assim, foram escolhidas a faixa de pH entre 3 e 10 para a focalização e a concentração de 12,5% de poliacrilamida na segunda dimensão.

Figura 7 - Gel bidimensional teórico de proteínas (em preto) e secretadas pelo sistema Sec dependente (em vermelho) de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130.

Análise realizada utilizando o programa JVirGel V.2.0, cromossomo I (3394 proteínas no total e 304 secretadas)

B-

Análise realizada utilizando o programa JVirGel V.2.0, cromossomo II (265 proteínas no total e 19 secretadas)

Figura 8 - Gel bidimensional teórico de proteínas totais (em preto) e secretadas pelo sistema Sec dependente (em vermelho) de *Leptospira biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc 1 - Paris.

Análise realizada utilizando o programa JVirGel V.2.0, cromossomo I (3391 proteínas no total e 374 secretadas)

B-

Análise realizada utilizando o programa JVirGel V.2.0, cromossomo II (276 proteínas no total e 30 secretadas);

C-

Análise realizada utilizando o programa JVirGel V.2.0, Plasmídeo (59 proteínas no total e 4 secretadas)

Com os parâmetros de faixa de pH e concentração de poliacrilamida escolhidos, os géis bidimensionais foram feitos utilizando-se os extratos de proteínas extracelulares obtidos segundo o fluxograma na figura 6. Nas figuras 9 e 10 são mostrados dois géis com as amostras de proteínas secretadas por *L. interrogans*, cultivada em meio EMJH enriquecido com BSA (GEL A - Figura 9) ou com o soro de coelho (GEL B - Figura 10).

Figura 9 - Gel bidimensional de proteínas secretadas pela *L. interrogans* (GEL A). Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com BSA.

Figura 10 - Gel bidimensional de proteínas secretadas pela *L. interrogans* (GEL B). Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com soro de coelho

Nas figuras 11 e 12, são mostrados dois géis com as amostras de proteínas secretadas por *L. biflexa*, cultivada em meio EMJH enriquecido com BSA (GEL C - Figura 11) ou com o soro de coelho (GEL D - Figura 12).

Figura 11 - Gél bidimensional de proteínas secretadas pela *L. biflexa* (GEL C). Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com BSA.

Em destaque estão os *spots* identificados.

Figura 12 - Gel bidimensional de proteínas secretadas pela *L. biflexa* (GEL D). Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com soro de coelho.

A análise dos géis mostrou que o protocolo utilizado para obtenção das proteínas secretadas foi eficiente, não apresentando problemas de condutividade e arrastes horizontais. Com exceção do gel D da figura 12, que apresentou uma separação não adequada na primeira dimensão. Os *spots* detectados foram recortados dos géis bidimensionais, reduzidos, alquilados e digeridos com tripsina.

Os peptídeos obtidos da digestão dos *spots* com tripsina foram separados por cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas automatizada (LC/MS/MS - Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry) disponível no Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório de Biociências (LNBio) para determinação das massas e sequenciamento. Utilizando o servidor público Mascot (<http://www.matrixscience.com>), as proteínas foram identificadas através de dois bancos de

dados, o NCBI e os próprios bancos de dados gerados pelos projetos genomas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I - Paris. Os parâmetros utilizados na busca foram: máximo de uma clivagem enzimática perdida; clivagem pela tripsina, carbamidometilação da cisteína e possível modificação por oxidação da metionina.

Os pontos isoelétricos e as massas moleculares experimentais das proteínas identificadas nos *spots* não foram determinados, pois o programa de análise de géis bidimensionais, o ImagemasterTM Platinum (*GE Healthcare*), não estava disponível para uso.

Na tabela 1, estão resumidos os resultados obtidos de identificação das proteínas utilizando gel bidimensional. As listas das proteínas identificadas estão nas tabelas A1, A2, A3 e A4, em apêndice, que contêm as informações dos géis A, B, C e D, respectivamente.

Tabela 1 - Resumo dos resultados obtidos a partir dos géis bidimensionais.

Gel Bidimensional	Resultados
Gel A	54 <i>spots</i> recortados
<i>L. interrogans</i> – BSA	50 análises positivas
Tabela I no anexo	33 proteínas diferentes identificadas
Gel B	44 <i>spots</i> recortados
<i>L. interrogans</i> – Soro	22 análises positivas
Tabela II no anexo	11 proteínas diferentes identificadas
Gel C	194 <i>spots</i> recortados
<i>L. biflexa</i> – BSA	40 análises positivas
Tabela III no anexo	16 proteínas diferentes identificadas
Gel D	44 <i>spots</i> recortados
<i>L. biflexa</i> – Soro	43 análises positivas
Tabela IV no anexo	30 proteínas diferentes identificadas

4.3 Repetição dos géis para confirmação do perfil bidimensional dos extratos de proteínas secretadas utilizando eletroforese em segunda dimensão

Para confirmação do perfil proteico nos géis bidimensionais, foi realizada a duplicata dos géis bidimensionais de cada amostra avaliada. Nas figuras 13 e 14, são mostrados os géis de cada amostra de proteínas secretadas por *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm (LPF), cultivada em meio EMJH enriquecido com BSA (Figura 13) ou com o soro de coelho (Figura 14) e nas figuras 15 e 16 as duplicatas da espécie não-patogênica, *Leptospira biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (PATOC) cultivada em meio EMJH enriquecido com BSA (Figura 15) ou com o soro de coelho (Figura 16). É possível observar que os perfis observados nos géis bidimensionais são semelhantes aos obtidos anteriormente para a identificação das proteínas.

Figura 13 - Triplicata dos géis bidimensionais de proteínas secretadas pela *L. interrogans* Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de noliacrilamida (SDS-PAGE 12.5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com BSA.

Figura 14 - Triplicata dos géis bidimensionais de proteínas secretadas pela *L. interrogans* Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com soro de coelho.

Figura 15 - Triplicata dos géis bidimensionais de proteínas secretadas pela *L. biflexa*. Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com BSA.

Figura 16 - Triplicata dos géis bidimensionais de proteínas secretadas pela *L. biflexa* Faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) corado com prata. Cultivo em meio enriquecido com soro de coelho.

4.4 Identificação de proteínas secretadas utilizando amostras líquidas e espectrometria de massas

Uma das limitações da separação de misturas proteicas utilizando géis bidimensionais é a presença de proteínas de difícil solubilização, que geralmente, são perdidas durante a preparação das amostras. Na focalização isoeletrica, as proteínas devem ser completamente solubilizadas, desagregadas, desnaturadas e reduzidas. As condições dos tampões utilizados não possibilitam as condições ideais de solubilização de todas as proteínas presentes na mistura. Para minimizar estes problemas, foi realizada a análise de amostras complexas em solução, complementando-se assim os dados obtidos através dos géis bidimensionais.

Os extratos de proteínas extracelulares de *L. interrogans* e de *L. biflexa* foram obtidos segundo protocolo esquematizado na figura 6. As amostras liofilizadas foram ressuspensas em solução de 50 mM de bicarbonato de amônio, num volume para concentrar 100 vezes a amostra. Posteriormente, as proteínas presentes na mistura foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina.

Os peptídeos obtidos da digestão com tripsina foram separados por LC/MS/MS disponível no LNBio para determinação das massas e sequenciamento. Utilizando o servidor público Mascot (<http://www.matrixscience.com>), as proteínas foram identificadas através de dois bancos de dados, o NCBI e os próprios bancos de dados gerados pelos projetos genomas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 e *Leptospira biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I - Paris. Os parâmetros utilizados na busca foram: máximo de uma clivagem enzimática perdida; clivagem pela tripsina, carbamidometilação da cisteína e possível modificação por oxidação da metionina (os mesmo para os *spots*).

Foram realizados experimentos em duplicata de extratos de proteínas extracelulares de *L. interrogans* obtidos a partir de cultivos enriquecidos com BSA ou soro de coelho. E, para a *L. biflexa*, foram realizados experimentos em duplicata de extratos de proteínas extracelulares obtidos a partir de cultivos enriquecidos com BSA e em quaduplicatas para o enriquecimento com soro. Na tabela 2, estão resumidos os resultados obtidos de identificação das proteínas utilizando misturas complexas em solução. As listas das proteínas identificadas, em cada amostra, estão nas tabelas A5 a B11, em apêndice.

Tabela 2 - Resumo dos resultados obtidos com as amostras líquidas.

Amostra	Resultados
Amostras - BSA 1 <i>L. interrogans</i> Tabela V no anexo	100 proteínas diferentes identificadas
Amostra - BSA 2 <i>L. interrogans</i> Tabela VI no anexo	99 proteínas diferentes identificadas
Amostra - SORO 1 <i>L. interrogans</i> Tabela VII no anexo	35 proteínas diferentes identificadas andamento
Amostra - SORO 2 <i>L. interrogans</i> Tabela VIII no anexo	32 proteínas diferentes identificadas
Amostra- SORO 1 <i>L. biflexa</i> Tabela IX no anexo	20 proteínas diferentes identificadas
Amostra- SORO 2 <i>L. biflexa</i> – Soro Tabela X no anexo	23 proteínas diferentes identificadas
Amostra- SORO 3 <i>L. biflexa</i> – Soro Tabela XI no anexo	55 proteínas diferentes identificadas
Amostra- SORO 4 <i>L. biflexa</i> – Soro Tabela XII no anexo	51 proteínas diferentes identificadas
Amostra – BSA 1 <i>L. biflexa</i>	42 proteínas diferentes identificadas
Amostra – BSA 2 <i>L. biflexa</i>	37 proteínas diferentes identificadas

4.5 Análise in silico dos prováveis mecanismos envolvidos na secreção de proteínas identificadas de *L.interrogans* e *L.biflexa*

Os programas SignalP versão 4.0 e TatP versão 1.0 foram utilizados para localizar possíveis sequências sinais de secreção nas proteínas identificadas nos extratos de proteínas extracelulares de *L.interrogans* e *L.biflexa*. Estes programas foram construídos para identificar a presença de sequências sinais Sec-dependente e Tat-dependente, respectivamente. O programa SecretomeP versão 2.0 foi utilizado para a predição de proteínas secretadas por mecanismos não clássicos, ou seja, independente da presença de peptídeo sinal.

Nas tabelas A1 a B11, em apêndice, estão listados os resultados completos obtidos com a análise *in silico*. Abaixo, serão discutidos os detalhes de cada programa.

4.5.1 Proteínas com peptídeo sinal Sec-dependente

Em bactérias Gram-negativas, muitas proteínas secretadas são traduzidas com sequência sinal amino terminal que é clivada por peptidases durante ou após a translocação. O SignalP 4.0 é um dos programas mais utilizados na predição de proteínas secretadas por sistemas dependentes da presença de peptídeo sinal Sec, também conhecido com clássicos. Seu funcionamento é baseado na identificação destas sequências sinais e seus respectivos sítios de clivagem pela peptidase sinal I (PETERSEN et al., 2011).

Na análise realizada utilizando-se este programa, do total de proteínas identificadas por espectrometria de massas, 28 apresentaram um provável peptídeo sinal amino terminal, sendo 14 de *L.interrogans* e 14 de *L.biflexa* (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Proteínas com sequência sinal Sec-dependente identificadas no extrato de proteínas extracelulares de *L.interrogans*

Identificação	Número do acesso	Nomenclatura do gene	Anotação do Genoma
Spot B31	gi 45655978	LIC10064	Proteína hipotética
BSB1	gi 45656096	LIC10191	Proteína OmpA
/BSA2/ SORO1/ SORO2			
BSA1/BSA2/ SORO1	gi 45657230	LIC11352	Lipoproteína LipL32
BSA1/BSA2/ SORO2	gi 45656646	LIC10752	Proteína ribossomal L7/L12
BSA1/BSA2/ SORO2	gi 45658793	LIC12966	Lipoproteína LipL41
BSA1/BSA2/ SORO2	gi 45656311	LIC10411	Proteína hipotética
BSA1/BSA2/ SORO2	gi 45656218	LIC10314	Proteína hipotética
BSA1/BSA2/ SORO1/ SORO2	gi 45658886	LIC13060	Lipoproteína LipL36
SORO1/ SORO2	gi 45659174	LIC13355	Lipoproteína
SORO1/BSA2/ SORO2/	gi:45656006	LIC10095	Proteína hipotética
SORO1/ SORO2	gi 45656896	LIC11009	Proteína hipotética
BSA1/BSA2/ SORO2	gi 45656890	LIC11003	Lipoproteína LipL71
BSA2/ SORO2	gi 45655964	LIC10050	Proteína hipotética
SORO2	gi 45658813	LIC12986	Proteína hipotética

Tabela 4 - Proteínas com sequência sinal Sec-dependente identificadas no extrato de proteínas extracelulares de *L.biflexa*

Identificação	Número do acesso	Nomenclatura do gene	Anotação do Genoma
Spot C3	gi 183220671	LEPBI_I1281	Carbamoil Fosfato Sintetase
Spot C18	gi 183220655	LEPBI_I1264	Transportador ABC
SORO 3/4	gi 183221355	LEPBI_I1973	Proteína L7/L12 da subunidade 50S ribossomal.
Spot D28 SORO 1/2/3/4	gi 183220863	LEPBI_I1476	Transportador ABC ligante ao substrato
Spot D40	gi 183220390	LEPBI_I0986	Proteína hipotética
SORO 1/3	gi 183222206	LEPBI_I2857	Proteína hipotética
SORO 1	gi 183222811	LEPBI_I3472	Transportador ABC ligante a ATP
SORO 1/2/4	gi 183222206	LEPBI_I2857	Proteína hipotética
SORO 1/2/3/4	gi 183222384	LEPBI_I3038	Proteína hipotética
SORO 2/3/4	gi 183221499	LEPBI_I2117	Proteína hipotética
SORO 1/2/3/4	gi 183222028	LEPBI_I2670	Proteína hipotética
SORO 1/3/4	gi 183222590	LEPBI_I3245	Proteína hipotética
SORO 4	gi 183220806	LEPBI_I1417	Proteína hipotética
SORO 1	gi:183222216	LEPBI_I2867	Proteína hipotética

No extrato de proteínas extracelulares de *L.interrogans*, foram identificadas várias proteínas hipotéticas, ou seja, que não apresentam similaridade com proteínas descritas em outros organismos. E, também, cinco prováveis lipoproteínas (Tabela 3).

Analisando os genomas de *Leptospira* já descritos, é possível observar a presença de diversas proteínas hipotéticas. Estas são proteínas sem função conhecida, que podem ser objeto de futuros estudos. Curreem et al. (2012) revisaram diversos trabalhos de extrato de proteínas extracelulares de bactérias patogênicas em que várias proteínas hipotéticas foram identificadas e relacionadas à patogênese.

As lipoproteínas bacterianas possuem uma cisteína amino terminal covalentemente ligada a ácidos graxos. São sintetizadas com um peptídeo sinal que é clivado por uma peptidase sinal (Lsp) antes da ligação covalente aos ácidos graxos, normalmente palmitato (HAYASHI; WY, 1990). Análise das sequências dos peptídeos sinais de 26 lipoproteínas de espécies de *Leptospira*, *Treponema*, *Borrelia* e *Brachyspira* com evidências experimentais de lipidação revelaram que o sítio de clivagem da Lsp ocorre depois da cisteína e corresponde a

sequência consenso: [L, A, S]₋₄ [L, V, F, I]₋₃ [I, V, G]₋₂ [A, S, G]₋₁ C₊₁ localizada na região carboxi terminal do peptídeo sinal, chamada *lipobox* (HAAKE, 2000; CULLEN et al., 2004; SETUBAL et al., 2006). Esta sequência é divergente do *lipobox* de lipoproteínas bem caracterizadas de *E.coli* e de outras bactérias Gram-negativas. A análise das sequências dos genomas de seis espécies de espiroquetas utilizando o *lipobox* divergente revelou um número maior de prováveis lipoproteínas do que a predição feita anteriormente com a sequência *lipobox* padrão (SETUBAL et al., 2006). Para a *L. interrogans* sorovar Copenhageni foram identificadas 157 lipoproteínas utilizando *lipobox* de espiroquetas e apenas 47 foram preditas com sequência típica (NASCIMENTO et al., 2004a; SETUBAL et al., 2006). Esta diversidade sugere que muitas funções celulares podem ser dependentes das lipoproteínas, como formação e estabilização da parede celular, transporte de substratos, interação bactéria-hospedeiro, virulência, entre outras.

O SignalP não realiza a predição de sítios de clivagem para as sequências sinais de lipoproteínas. A identificação das cinco lipoproteínas (tabela 3) deve ter ocorrido por erro de análise. O processamento das lipoproteínas bacterianas ocorre no espaço periplasmático, depois da translocação da proteína através da membrana citoplasmática, pela maquinaria de secreção Sec. Posteriormente, as proteínas lipidadas associam-se com as membranas da bactéria através de interações hidrofóbicas entre a porção lipídica e a membrana, podendo estar localizadas na face periplasmática da membrana citoplasmática, no folheto interno da membrana externa ou no folheto externo da membrana externa. Os fatores que determinam esta localização não são bem entendidos. Portanto, não é esperada a presença de lipoproteínas no extrato de proteínas extracelulares (YAMAGUCHI et al., 1988; SEYDEL et al., 1999). Entretanto, algumas lipoproteínas de *Leptospira* spp. já foram encontradas no meio extracelular, como LipL32 (BRANGER et al., 2005) e a lipoproteína com domínio IgG-like (LigA) (MATSUNAGA et al., 2007).

A LipL32 é a mais abundante proteína de espécies patogênicas de *Leptospiras*, sem função conhecida (HAAKE et al., 2000). Branger et al. (2005) demonstraram a presença desta lipoproteína no sobrenadante com cultivo da *L. interrogans* sorovar Autumnalis. Esta proteína também foi identificada, neste trabalho de tese, em amostras complexas em solução de extratos de proteínas extracelulares obtidos do cultivo com meio EMJH enriquecido com BSA da *L. interrogans* (Tabela 3).

A LigA pertencente à uma família de proteínas bacterianas que se caracterizam pela presença de domínios Big repetidos. Está localizada, principalmente, na membrana externa da bactéria e participa dos processos de adesão das leptospiros às células do tecido do hospedeiro

(MATSUNAGA et al., 2003). Matsunaga et al. (2007) mostraram a presença da LigA no sobrenadante do cultivo somente com o aumento da osmolaridade do meio para próximo aos nível fisiológicos encontrados nos hospedeiros mamíferos. Esta proteína não foi identificada nos extratos de proteínas secretadas de *L.interrogans*, provavelmente, porque as condições de osmolaridade do cultivo são menores que as utilizadas por Matsunaga et al. (2007).

Para a confirmação experimental da existência de lipoproteínas extracelulares por proteômica é necessário observar a ausência do resíduo de cisteína ligado aos ácidos graxos e consequentemente, uma massa molecular menor do que as formas ancoradas à membrana plasmática. Entretanto, neste trabalho, as lipoproteínas só foram identificadas nas misturas complexas em solução e por esta razão a massa molecular experimental não foi obtida.

Tem sido discutido que as lipoproteínas são provavelmente liberadas para fora da célula por “*shaving*” proteolítico depois do processamento pela SPase II (ANTELMANN et al., 2001). Eymann et al. (1996) identificaram várias lipoproteínas com massas moleculares menores no secretoma de *Bacillus subtilis*, demonstrando a presença de mecanismos de secreção destas proteínas.

No extrato de proteínas extracelulares de *L.biflexa*, também foram identificadas várias proteínas hipotéticas e proteínas transportadoras do tipo ABC. Estas últimas são componentes do sistema de secreção do Tipo I e estão localizadas na membrana interna. Este sistema permite a secreção de toxinas, enzimas hidrolíticas e vários fatores de virulência (DAVIDSON et al., 2008). Considerando que a *L.biflexa* é saprofita, estes transportadores ABC talvez tenham assumido outra função nesta espécie de leptospira ou são resultado da contaminação pela lise celular.

4.5.2 Proteínas com peptídeo sinal Tat-dependente

O programa TatP prediz a presença e a localização de sequências sinais do sistema Tat-dependente. É capaz de discriminar proteínas com motivos Tat de proteínas citoplasmáticas que possuem motivos similares e proteínas secretadas pelo sistema Sec-dependente (BENDTSEN et al., 2005b). Somente três proteínas identificadas no extrato de proteínas extracelulares de *L.interrogans* possuem motivos Tat. A proteína codificada pelo gene LIC10764 (identificada na amostra BSA 1), que possui um domínio DUF520 de função desconhecida; a proteína codificada pelo gene LIC10064, identificada no *spot* B31 e a proteína codificada pelo gene LIC12047, identificada na amostra BSA 1, estas duas últimas não possuem domínios conservados conhecidos, são proteínas hipotéticas.

Em *L.biflexa* quatro proteínas com motivos Tat foram identificadas. A proteína codificada pelo gene LEPBI_I1281, que possui domínios conservados de carbamoil fosfato sintetase. Em procariotos, esta enzima é capaz de promover a hidrólise de glutamina em ureia e participar da síntese de carbamoil fosfato. Além disso, possui os domínios pfam13535 e pfam00289 de função não conhecida. A segunda proteína identificada foi a codificada pelo gene LEPBI_I1264, anotada no genoma como transportador ABC ligante ao substrato, e possui um domínio de ligação a metais. Estas duas proteínas identificadas pelo programa TatP foram identificadas no gel C (*spots* C3 e C18) que corresponde ao meio com BSA.

A terceira proteína identificada é a codificada pelo gene LEPBI_I1476, que também possuem domínios conservados de transportadores do tipo ABC ligantes à proteínas. A última proteína é a codificada pelo gene LEPBI_I0986, que não possui domínios de função conhecida. Estas duas proteínas foram identificadas no gel D (*spots* D28 e D40) que corresponde ao meio com soro.

Estas quatro proteínas de *L.biflexa* que possuem domínios Tat também foram identificada pelo programa SignalP versão 4.0, como mostrado na tabela 3.

4.5.3 Proteínas secretadas por mecanismos não clássicos

O programa SecretomeP identifica proteínas secretadas pela via não clássica, ou seja, independente da presença de sequência sinal. Os algoritmos deste programa foram determinados através da comparação da composição de aminoácidos, estrutura secundária e a presença de regiões desordenadas em proteínas secretadas experimentalmente comprovadas. Algumas destas proteínas apresentam uma função citoplasmática e também, funções extracelulares que muitas vezes são diferentes, por este motivo têm sido denominadas *moonlighting* (BENDTSEN et al., 2005a).

Várias proteínas já foram descritas serem secretadas por mecanismos não clássicos, como a glutamina sintetase de *Mycobacterium tuberculosis* (HARTH et al., 1994); a superóxido desmutase de *M.tuberculosis* (HARTH et al., 1999); enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos (enolase, piruvato desidrogenase, malato desidrogenase), metabolismo de aminoácidos (arginase e pirrolina-5- carboxilato desidrogenase), proteínas de quimiotaxia e motilidade (componente estruturais do flagelo), proteínas de detoxicação como a catalase e superóxido dismutase, fatores de alongação e GroEL no secretoma de *Bacillus subtilis* (ANTELMAN et al., 2001; HIROSE et al.,2000; VITIKAINEN et al., 2004)

Este programa identificou 27 proteínas possivelmente secretadas por mecanismos não clássicos no extrato de proteínas extracelulares de *L.interrogans* (Tabela 5). No extrato de proteínas extracelulares de *L.biflexa* foram identificadas 21 proteínas (Tabela 6).

Tabela 5 - Proteínas secretadas por mecanismos não clássicos identificadas no extrato de proteínas extracelulares de *L.interrogans*

Identificação	Número do acesso	Nomenclatura do gene	Anotação do Genoma
<i>Spot</i> A6 BSA2/ SORO1/ SORO2	gi 45658174	LIC12326	Proteína hipotética
A7	gi 45656214	LIC10310	Proteína H do sistema clivagem de glicina
<i>Spot</i> A20	gi 45656733	LIC10842	Di-hidro-dipicolinato sintase
<i>Spot</i> A22	gi 304570499	LIC12323	3-Oxoacil sintase
<i>Spot</i> A27 BSA1/BSA2/	gi 45659137	LIC13318	Ácido Graxo sintase
<i>Spot</i> A31/ BSA2	gi 45658181	LIC12335	Serina hidroximetiltransferase
<i>Spots</i> A36/B22/ B23/B24/B25/ B29/B30	gi 45658468	LIC12631	Hemolisina
<i>Spot</i> A49	gi 45656765	LIC10874	Molibdopterina oxidoredutase
BSA1/BSA2	gi 161621774	LIC11781	Malato desidrogenase
BSA1/BSA2	gi 45656423	LIC10525	Proteína choque térmico GrpE.
BSA1/BSA2	gi 45656422	LIC10524	Proteína de choque térmico DnaK
BSA1/BSA2/ SORO1/ SORO2	gi 45657374	LIC11499	Proteína hipotética
BSA1/BSA2	gi 45658540	LIC12705	Fator de início da tradução (IF2)
BSA1/BSA2	gi 45657317	LIC11441	Proteína hipotética
BSA1/BSA2/ SORO1/ SORO2	gi 45659173	LIC13354	Proteína hipotética
SORO1	gi 45656973	LIC11089	Proteína hipotética
SORO1/ SORO2	gi 45655777	LIC20197	cisteína protease
SORO1	gi 45659283	LIC13467	Proteína hipotética
BSA1	gi 45657553	LIC11687	phospholipase dependente de zinco
BSA1	gi 45656736	LIC10845	Proteína Hipotética
BSA1	gi 45656263	LIC10360	Flavoproteína
BSA1	gi 45655785	LIC20205	Proteína Hipotética
BSA1	gi 45655824	LIC20249	Aconitase (aconitato hidratase)
BSA1/BSA2	gi 45658609	LIC12776	Proteína Ribossomal 50S ,L21
BSA2	gi 45656498	LIC10600	Ácido graxo sintetase
BSA2	gi 45657938	LIC12090	Gliceraldeído-3-Fosfato-desidrogenase
BSA2	gi 45658671	LIC12841	Diaminopimelato Aminotransferase

Tabela 6 - Proteínas secretadas por mecanismos não clássicos identificadas no extrato de proteínas extracelulares de *L.biflexa*.

Identificação	Número do acesso	Nomenclatura do gene	Anotação do Genoma
<i>Spots</i> C10/C11/ C12/C13/ C14/D3/D5 SORO 3	gi 189913417	LEPBI_II0249	Aconitato hidratase
<i>Spots</i> C38/C39/ C40/C41/D12/ D12/D14 SORO 1/2/3/4	gi 183222336	LEPBI_I2989	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
<i>Spot</i> D16	gi 183220372	LEPBI_Ia0966	Chaperona <i>trigger factor 1</i>
<i>Spot</i> D15	gi 183221095	LEPBI_I1709	Provável Protease PmbA
<i>Spot</i> D24/ SORO 4	gi 183220196	LEPBI_I0786	Acil-desidratase
SORO 4	gi 183219941	LEPBI_I0523	serina endopeptidase
<i>Spot</i> D38 SORO 2/3/4	gi 183219454	LEPBI_I0027	Superóxido dismutase
<i>Spot</i> D31	gi 183220847	LEPBI_I1460	Proteína hipotética
<i>Spot</i> D33 SORO 1/2/3/4	gi 189913316	LEPBI_II0146	Peroxidase
<i>Spot</i> D41	gi 183222534	LEPBI_I3189	Proteína H do sistema clivagem de glicina
SORO 3/4	gi 183222511	LEPBI_I3166	Provável MaoC-like desidratase
SORO 1/2	gi 183222771	LEPBI_I3430	Proteína hipotética
SORO 2	gi 183222142	LEPBI_I2785	Proteína hipotética
SORO 3/4	gi 183222463	LEPBI_I3117	Álcool desidrogenase
SORO 3	gi 183220361	LEPBI_I0957	Proteína hipotética
SORO 3	gi 183219477	LEPBI_I0050	3-oxoacyl-ACP redutase
SORO 3	gi 183219973	LEPBI_I0555	Proteína hipotética
SORO 4/3	gi 183220541	LEPBI_I1144	Malato desidrogenase
SORO 3/4	gi 183222724	LEPBI_I3380	Proteína de choque térmico - GrpE
SORO 3/4	gi 183221439	LEPBI_I2057	Succinil-CoA sintetase
SORO 3/4	gi 183222072	LEPBI_I2714	Hidroxiethylthiazole quinase
BSA 2	gi 183222253	LEPBI_I2904	Thiol peroxidase
BSA 2	gi 183220530	LEPBI_I1132	Flavoproteína de transferência de elétrons

Das 27 proteínas possivelmente secretadas por mecanismos não clássicos no extrato de proteínas extracelulares de *L.interrogans* (Tabela 5), foi encontrada a hemolisina/esfingomielinase Sph2 (LIC12631), que possui um domínio exonuclease-endonuclease-fosfatase, encontrado em muitas esfingomielinases. Estas enzimas são responsáveis pela hidrólise da esfingomielina, um fosfolípido constituinte da membrana

plasmática de células animais. A atividade das esfingomielinases é responsável pela hemólise, que está associada à liberação de ferro, essencial para a sobrevivência bacteriana, e de lipídeos da membrana como fonte de carbono e energia, além de causar a morte celular no hospedeiro (ARTIUSHIN et al., 2004; ZHANG et al., 2008).

A Sph2 está presente somente em espécies patogênicas de leptospiros e foi comprovado ser secretada, por Matsunaga et al. (2007). Estes pesquisadores mostraram a presença desta enzima no sobrenadante do cultivo somente com o aumento da osmolaridade do meio para próximo aos níveis fisiológicos encontrados nos hospedeiros mamíferos. Tem sido proposto que a indução osmótica de Sph2 poderia ter um papel protetor, pois a fosfocolina produzida pela atividade da esfingomielinase poderia ser convertida em uma betaína derivada de glicina que é um protetor osmótico (SHORTRIDGE et al., 1992).

Também estiveram presentes nesta busca de proteínas secretadas por mecanismos não clássicos, oito proteínas hipotéticas, proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos; como a proteína H do sistema clivagem de glicina (LIC10310), di-hidro-dipicolinato sintase (LIC10842) envolvida na síntese da lisina e a serina hidroximetiltransferase (LIC12335) que faz a interconversão do aminoácido treonina em glicina e acetaldeído; no metabolismo de carboidratos, como a malato desidrogenase (LIC11781); proteínas de choque térmico, como a GrpE (LIC10525) e DnaK (LIC10524); entre outras.

No extrato de proteínas extracelulares de *L. biflexa* foram encontradas 23 proteínas possivelmente secretadas por mecanismos não clássicos (Tabela 6), entre estas está a superóxido dismutase (LEPBI_I0027), que já foi identificada nos secretomas de outros patógenos (ANTELMANN et al., 2001; HARTH et al., 1999, 1994; SCHAUMBURG et al., 2004). Esta enzima catalisa a dismutação do radical superóxido. Devido a esta atividade, é uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio. O superóxido pode destruir os componentes vitais da célula, inclusive o DNA. Nos microrganismos aeróbios, a enzima superóxido dismutase elimina os radicais superóxido convertendo-os rapidamente em peróxido de hidrogênio, que pode ser metabolizado por duas outras enzimas; a catalase, que converte peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água e a peroxidase, que converte peróxido de hidrogênio em água. A peroxidase (LEPBI_II0146) e a Thiol peroxidase (LEPBI_I2904) também foram identificadas nesta busca, demonstrando a existência de três proteínas de detoxicação importantes, a superóxido dismutase e a catalase.

Também foram encontradas, proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos; como a proteína H do sistema clivagem de glicina (LEPBI_I3189), no metabolismo de

carboidratos, como a malato desidrogenase (LEPBI_I1144); proteínas de choque térmico, como a GrpE (LEPBI_I3380), entre outras.

4.5.4 Análise da provável localização das sequências de proteínas anotadas nos genomas de *Leptospiras spp.* e das proteínas identificadas de *L. interrogans* e *L. biflexa*.

As sequências de proteínas anotadas nos genomas disponíveis de *Leptospira spp.* e das proteínas de *L. interrogans* e *L. biflexa* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 foram analisadas utilizando-se o programa PSORTb 3.0 de predição da sublocalização celular

O programa PSORTb versão 3.0 é muito utilizado na análise da localização celular e anotação de genomas. Na versão 3.0, a predição consiste de uma análise múltipla que leva em conta várias características que influenciam na sublocalização celular, entre elas a presença de domínios conhecidos em proteínas já caracterizadas (YU et al., 2010).

Na tabela 7, estão resumidos os resultados das análises dos genomas de *Leptospira spp.* É possível verificar que a proporção de proteínas secretadas é baixa, variando de 0,8 a 2% do total de sequências analisadas. E, a predição de proteínas de múltipla localização ou não determinada é alta, indicando a necessidade de mais dados experimentais.

Tabela 7 - Análise *in silico* da provável localização das proteínas utilizando o programa PSORTb versão 3.0

Predição da localização celular	<i>L.interrogans</i>		<i>L.borgpetersenii</i>		<i>L.biflexa</i>	
	Copenhageni L1-130	Lai 56601	Hardjo-bovis L550	Hardjo-bovis JB197	Patoc 1 (Ames)	Patoc 1 (Paris)
Citoplasmática	1673	1742	1599	1559	1695	1708
Membrana	666	660	531	509	783	795
Citoplasmática						
Membrana	62	62	25	24	44	46
Externa						
Periplasma	29	29	26	25	40	38
Extracelular	63	62	25	24	44	46
Múltipla	86	87	73	73	97	93
localização						
Não determinada	1079	1053	637	635	878	983

Os resultados das análises da provável localização das proteínas identificadas nos extratos de proteínas secretadas de *L.interrogans* e *L.biflexa* utilizando o programa PSORTb versão 3.0 estão listados nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Análise *in silico* da provável localização das proteínas identificadas no extrato de proteínas extracelulares de *L.interrogans* utilizando o programa PSORTb versão 3.0

Identificação	Número do acesso	Nomenclatura do gene	Anotação do Genoma
<i>Spots</i> A36/B22/B23 B24/B25/B29/B30 SORO1	gi 45658468	LIC12631	Hemolisina
<i>Spots</i> A37/A38/B19 B20/SORO1/ SORO2	gi 45657338	LIC11463	Provável esterase/lipase
<i>Spot</i> A53/ BSA1/SORO 1/ SORO 2	gi 45656816	LIC10927	Pectinacetilesterase
<i>Spot</i> B27/ SORO1	gi 45658083	LIC12234	Proteína hipotética
<i>Spot</i> B36	gi 45657379	LIC11504	Proteína hipotética
SORO2	gi 45658813	LIC12986	Proteína hipotética

Tabela 9 - Análise *in silico* da provável localização das proteínas identificadas no extrato de proteínas extracelulares de *L.biflexa* utilizando o programa PSORTb versão 3.0.

Identificação	Número do acesso	Nomenclatura do gene	Anotação do Genoma
SORO 1,2,3,4	gi 183222384	LEPBI_I3038	Proteína hipotética
SORO 1,2	gi 183222771	LEPBI_I3430	Proteína hipotética
SORO 1	gi 183222216	LEPBI_I2867	Proteína hipotética
SORO 4	gi 183219511	LEPBI_I0084	Quinase nucleosídeo difosfato

O programa PSORTb identificou 6 proteínas de *L.interrogans* e 4 de *L.biflexa*. Sendo que destas, a proteína codificada pelo gene LIC12631 (hemolisina Sph2) já tinha sido identificada anteriormente como secretada por mecanismos não clássicos (Tabela 5) e as proteínas LEPBI_I3038 e LEPBI_I2867 como secretadas por mecanismos Sec dependentes e a LEPBI_I3430 por mecanismos não clássicos (Tabela 4). Isto ocorreu porque no PSORTb é realizada uma análise múltipla utilizando cinco módulos diferentes. Num destes módulos, a presença do peptídeo sinal é realizada pelo programa Signalp, o mesmo utilizado para prever a presença de sequência sinal.

As proteínas que não possuem peptídeo sinal são consideradas secretadas quando possuem domínios conservados semelhantes ao de proteínas já caracterizadas como

secretadas, como é o caso da hemolisina, que possuem uma homologia com esfingomielinases.

Outra proteína identificada nesta busca foi a provável esterase/lipase (LIC11463). As lipases (EC 3.1.1.3) e esterases (3.1.1.1) são um grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo de lipídios. São hidrolases que catalisam tanto a hidrólise como a síntese de acilgliceróis e outros ácidos graxos (LEE et al., 2004). Estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser produzidas por animais, plantas, fungos e bactérias (LIN et al., 2006).

Estas enzimas pertencem à superfamília das α/β hidrolases e possuem o sítio ativo formado por uma tríade catalítica contendo os resíduos de serina, aspartato ou glutamato e histidina. O resíduo de serina está no centro de um pentapeptídeo conservado, geralmente composto pelos resíduos GX SXG, onde G é glicina e X é qualquer aminoácido. Apesar de compartilharem um mecanismo catalítico comum e uma estrutura semelhante, as lipases/esterases podem apresentar diferentes especificidades de substratos e possuem sequências de aminoácidos muito variáveis (JAEGER et al., 1994; JAEGER et al., 1999). De maneira geral, as esterases hidrolisam ligações éster em ésteres e triacilgliceróis de cadeia carbônica curta (< 10 carbonos), libertando ácidos graxos de baixo peso molecular, e, por isso também são denominadas esterases não-lipolíticas (CHAHINIAN et al., 2005) ou apenas carboxilesterases (BORNSCHEUER, 2002). Já as lipases hidrolisam preferencialmente triacilgliceróis de cadeia longa (> 10 carbonos).

A atividade lipásica/esterásica tem sido demonstrada em cultivos totais e sobrenadantes de cultivos de *Leptospira* spp, entretanto os produtos destas reações enzimáticas ainda não são conhecidos e não há relatos sobre a caracterização de nenhuma lipase/esterase produzida por estas bactérias (PATEL et al., 1964).

Além disso, a presença de ácidos graxos no meio de cultivo é essencial para o crescimento das leptospiros, pois estas bactérias são incapazes de metabolizar os açúcares ou aminoácidos como fonte de energia e utilizam a β -oxidação de ácidos graxos ou álcoois graxos como fonte de carbono e energia (HENNEBERRY; COX, 1970). Nos genomas das leptospiros já disponíveis foram encontrados genes que codificam para a via completa da β -oxidação e para o metabolismo do glicerol (BULACH et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2004a, b; PICARDEAU et al., 2008; REN et al., 2003).

Estafilococos através da secreção de lipases são capazes de hidrolizar lipídios, liberando ácidos graxos que são assimilados pela bactéria servindo como precursores para

síntese de lipídios celulares ou como substratos para obtenção de energia (BARBOSA; TORRES, 1998).

4.6 Comparação das análises da provável localização das proteínas identificadas de *L.interrogans* e *L.biflexa*

A comparação dos resultados da provável localização das proteínas identificadas nos extratos de *L.interrogans* e *L.biflexa*, utilizando todas as análises efetuadas pelos programas SignalP versão 4.0, TatP versão 1.0; SecretomeP versão 2.0 e PSORTb versão 3.0, demonstrou a presença de muitas proteínas citoplasmáticas e algumas periplasmáticas e de membrana interna (Figura 17).

Figura 17 - Comparação das análises da provável localização das proteínas identificadas nos extratos de proteínas secretadas de *L.interrogans* (A) e *L.biflexa* (B).

A presença de proteínas citoplasmáticas, periplasmáticas e de membrana interna nos extratos de proteínas secretadas pode ser explicada de duas maneiras. Em primeiro lugar, as proteínas podem ter sido liberadas para o extrato como resultado da lise celular, apesar dos procedimentos adotados para minimizar contaminação citoplasmática, como a coleta das proteínas na fase logarítmica do cultivo e a filtragem das células residuais.

Além disso, é preciso considerar que a predição da função das proteínas nos bancos de dados genômicos pode conter informações imprecisas. Esta análise é feita por comparação de proteínas previamente caracterizadas, utilizando-se programas computacionais de alinhamento de sequências. Entretanto, neste processo pode ocorrer a propagação de erros, que é a predição da função de proteínas baseada em proteínas que também foram preditas, mas com dados incorretos.

A análise proteômica das proteínas secretadas pelos sorovares estudados neste projeto procurou confirmar a predição teórica destas proteínas através da múltipla análise com diferentes programas de bioinformática e da busca de domínios conservados conhecidos em proteínas secretadas por outras bactérias.

Os géis obtidos representaram perfis das amostras de proteínas secretadas, dos sorovares patogênico e saprófito, a 37 °C e 29 °C respectivamente, ambos avaliados nos dois enriquecimentos de meio de cultivo. Embora não tenha sido possível obter triplicatas dos géis, as análises complementares realizadas a partir das amostras em solução mostraram a presença repetida de proteínas nas duas condições.

Em relação cultivo, é possível verificar nos gráficos da figura 17 que no meio enriquecido com BSA ocorreu maior contaminação de proteínas provenientes do interior da célula. Enquanto, a utilização do meio enriquecido com soro de coelho propiciou a identificação de um maior número de proteínas preditas como extracelulares e não citoplasmáticas (com a presença de peptídeo sinal).

Os resultados alcançados a partir do uso das duas metodologias empregadas (análise a utilizando gel bidimensional e em solução) indicaram que estas técnicas são complementares, pois embora a tecnologia baseada em gel tenha fornecido os resultados de pI e identificação visual, diversas proteínas não identificadas em gel puderam ser identificadas a partir da tecnologia de amostras complexas em solução.

A proteína citoplasmática mais abundantes encontrada foi a GroEL no extrato de *L.interrogans* (LIC11335) e em *L.biflexa* (LEPBI_I2344). Esta chaperonina foi identificada em vários *spots* (A42 até A50, C29, C30 e D11) e em solução. Outras proteínas citoplasmáticas, de membrana interna e externa e enzimas metabólicas também foram identificadas nos extratos de proteínas secretadas (tabelas A1 a B11, em apêndice).

Miranda et al. (2009), em um estudo de *microarray*, mostraram a *up-regulação* dos genes codificantes de flagelinas, chaperoninas, proteínas de choque térmico (DnaK e GroEL) e enzimas metabólicas com o aumento de temperatura de 30 °C para 37 °C. A presença destas proteínas nos extratos de *L.interrogans* pode estar relacionado com o aumento da temperatura.

Entretanto, a presença de proteínas resultantes da contaminação pela lise celular não impediu a identificação de proteínas secretadas nos extratos estudados.

Até o momento, não existem, na literatura, registros de proteínas secretadas por espécies saprofíticas de *Leptospiras*. E, somente três proteínas de *Leptospira* patogênicas foram experimentalmente comprovadas serem secretadas, a LipL32 (BRANGER et al., 2005), a hemolisina Sph2 e a LigA (MATSUNAGA et al., 2004, 2007). Dentre estas, a LigA não foi identificada neste estudo, provavelmente porque foi observado sua secreção somente com aumento da osmolaridade e não com o aumento da temperatura.

Neste trabalho, nas amostras avaliadas de *L.interrogans* foram identificadas 159 proteínas diferentes, dentre elas 64 proteínas foram positivas em pelo menos uma das ferramentas de predição utilizadas. Em *L. biflexa*, foram identificadas 104 proteínas diferentes, dentre elas 43 proteínas positivas pela análise *in silico*.

4.7 Comparação qualitativa das proteínas identificadas na espécie saprofítica e patogênica usando a ferramenta BlastP

A partir da sequência em formato FASTA das proteínas identificadas como possivelmente secretadas e a ferramenta BlastP, foi possível a comparação qualitativa entre as proteínas de *L.interrogans* e *L.biflexa*. O grau de homologia/similaridade das proteínas identificadas nas duas espécies foi determinado para aferir a presença de proteínas exclusivamente na espécie patogênica (Tabelas C1 a C6, em apêndice).

A identificação de proteínas da bactéria, especialmente aquelas exclusivamente expressas em estirpe patogênica, pode trazer avanços importantes no conhecimento da biologia da bactéria e da interação entre patógeno e hospedeiro. Dentre as proteínas identificadas neste trabalho como sendo possivelmente secretadas por mecanismos clássicos ou não clássicos, as lipoproteínas LIC11352 (LipL32), LIC12966 (LipL41) e LIC13060 (LipL36), as proteína hipotéticas LIC11009 e LIC2986, LIC11441, LIC13354, além das proteínas 3-oxoacil sintase (LIC12323), a hemolisina/esfingomielinase Sph2 (LIC12631), a fosfolipase (LIC11687) e a proteína pectinacetilesterase (LIC10927) identificadas nos secretomas de *L. interrogans* apresentaram baixa similaridade (resultado menor que 40%) com proteínas presentes no banco de dados da *L. biflexa* através da análise feita a partir da ferramenta BlastP. O que pode sugerir a ausência destas proteínas na espécie saprófita (Tabelas C2, C4 e C6 em apêndice).

Dentre o total de proteínas de *L. biflexa* identificadas neste trabalho, seis apresentaram baixa similaridade (resultado menor que 40%) quando comparado ao banco de dados do genoma da estirpe patogênica (Tabela C1, C3 e C5 em apêndice).

4.8 Ensaio de atividade enzimática

4.8.1 Ensaio Fluorimétrico

Inicialmente, para as medidas de atividade proteolítica, foram utilizados os substratos com apagamento intramolecular de fluorescência FRETs, que apresentam no grupo N-terminal do peptídeo o radical fluorescente ácido orto-aminobenzóico (Abz) e no grupo carboxi-terminal o apagador da fluorescência N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina (EDDnp), e permitem o monitoramento direto, em espectrofluorímetro, da velocidade de hidrólise dos substratos (CHAGAS et al., 1995).

Para os ensaios foram selecionados os substratos Abz-FRSSRQ-EDDnp, Abz-GGFLRRV-EDDnp (análogo à Dinorfina), Abz-LYENKP-EDDnp (análogo a neurotensina) e Abz-GFXPFRQ-EDDnp e Abz-GFSYFRQ-EDDnp (sequências análogas à bradicinina e prostaglandina, onde X_1 = Ala, Ser e Asp e X_2 = Glu, Arg e Phe), além do controle negativo (PBS). Onde o aumento da fluorescência representa a ação de enzimas presentes na amostra.

Na figura 18, são mostrados os resultados obtidos com o substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp, que foi escolhido por ser um substrato universal, o qual é hidrolisado tanto por serinopeptidases quanto metalopeptidases, principais alvos deste estudo.

É possível observar que a hidrólise deste substrato foi verificada tanto no extrato de proteínas secretadas de *L. biflexa* (gráfico A), quanto no de *L. interrogans* (gráfico B). Embora seja verificada uma maior atividade nos ensaios com a espécie patogênica (gráfico B) a partir da correlação linear a cima de 90% entre os pontos, e o aumento da fluorescência.

Figura 18 - Avaliação da atividade enzimática das amostras de proteínas secretadas pela *L. interrogans*, utilizando-se o substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp

Gráfico A: Patoc: *L. biflexa* e Gráfico B: LPF: *L. interrogans*; UA: unidades de atividade enzimática específica (UF/min/ μ g. Dupli: Duplicata; Controle: controle negativo das duas reações (PBS + substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp). Foram realizados dois experimentos independentes com a mesma amostra.

Além do substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp, dois outros substratos foram avaliados com a amostra de proteínas secretadas por *L. interrogans* (Figura 19).

Figura 19 - Avaliação da atividade enzimática das amostras de proteínas secretadas pela *L. interrogans*, utilizando os substratos análogos a dinorfina (gráfico A) e da bradicinina (gráfico B).

Gráfico A: *L. interrogans* Ensaio do extrato de proteínas secretadas com análogo da dinorfina (Abz-GGFLRRV-EDDnp); Gráfico B: *L. interrogans* Ensaio do extrato de proteínas secretadas com análogo da bradicinina (Abz-GFSYFRQ-EDDnp); UF: unidade de fluorescência. Foram realizados dois experimentos independentes com a mesma amostra (em duplicata).

O ensaio com o substrato análogo à dinorfina (Abz-GGFLRRV-EDDnp) apresentou atividade específica de 234 UF/min/ μ g e 178 UF/min/ μ g (duplicata), e o ensaio com o análogo da bradiginina (Abz-GFSYFRQ-EDDnp) apresentou atividade específica de 221 UF/min/ μ g. Por outro lado, as análises de hidrólise com o peptídeo análogo à neurotensina demonstrou que as proteases presentes nas amostras não reconheceram esta sequência como substrato putativo.

A dinorfina é um peptídeo opióide secretado pelo organismo relacionado com controle da dor e a bradiginina está envolvida em processos de regulação de pressão e inflamatórios, o que poderia sugerir uma provável relação com a patogênese da leptospirose, abrindo possibilidade de novas buscas como candidatos de estudo.

4.8.2 Ensaio cromatográfico

A partir dos resultados dos ensaios fluorimétricos optou-se pelo ensaio de atividade de hidrólise utilizando como substrato a cadeia β da insulina oxidada, que tem como objetivo uma análise mais abrangente por oferecer num mesmo substrato vários pontos de hidrólise, aumentando a probabilidade de identificação de atividade proteolítica dos extratos proteicos avaliados.

Foi possível observar a presença de atividade proteolítica apenas nas amostras patogênicas quando comparado com as amostras saprófitas (Figuras 20 e 21) além de um maior número de picos de hidrólise na amostra de *L. interrogans* (patogênica) cultivada em meio enriquecido com soro de coelho.

Figura 20 - Cromatograma representativo das reações de hidrólise da cadeia β da insulina incubada com os extratos de proteínas secretadas por *L. interrogans* cultivadas com enriquecimento BSA (vermelho) e SORO (azul).

Em vermelho linha cromatográfica referente a incubação com o extrato de proteínas de *L. interrogans* em BSA, em azul, linha cromatográfica referente a incubação com o extrato de proteínas de *L. interrogans* em SORO de coelho.

Figura 21 - Cromatograma representativo das reações de hidrólise da cadeia β da insulina incubada com os extratos de proteínas secretadas por *L. biflexa* cultivadas com enriquecimento BSA (vermelho) e SORO (azul) e controle negativo (bordô).

Em vermelho linha cromatográfica referente a incubação com o extrato de proteínas de *L. biflexa* em BSA, em azul, linha cromatográfica referente a incubação com o extrato de proteínas de *L. biflexa* em SORO de coelho e em bordô, linha controle, apenas o substrato e o tampão.

A cadeia β da insulina oxidada, embora seja considerada como um substrato universal, pode não ter sido identificada como substrato putativo para as proteases presentes na amostra saprófita (Figura 22) explicando a ausência de picos de hidrólise observados no cromatograma. Por outro lado, no ensaio fluorimétrico também foi verificado uma baixa atividade proteolítica nas amostras de Patoc, isso pode estar relacionado a falta de estímulo *in vitro* específico para a secreção de proteases desta espécie.

Já a presença de atividade proteolítica na espécie patogênica nas condições estudadas (*shift* de temperatura) demonstra a presença de proteases possivelmente envolvidas na patogênese da doença.

A fim de identificar a classe de proteases mais frequente no secretoma, a mesma amostra de *L. interrogans* (soro) foi incubada com o substrato avaliado (cadeia β da insulina) e com inibidores classe específicos [inibidores de metalopeptidases (1-10 fenantrolina) e serinopeptidases (PMSF)].

Neste experimento, foi observada uma atividade exclusiva de metaloproteases no extrato proteico de *L. interrogans*, representada pela ausência dos picos de hidrólise (Figura 23 – linha bordô/ picos em destaque) na amostra incubada com 1-10 fenantrolina.

Figura 22 - Cromatograma representativo das reações de hidrólise da cadeia beta da insulina incubada com o extrato de proteínas secretadas por *L. interrogans* e inibidores classe específicos (PMSF e 1-10 fenantrolina).

Em vermelho linha cromatográfica referente ao controle positivo, em azul linha cromatográfica referente a incubação com o PMSF e linha bordô referente a incubação com 1-10 fenantrolina. Destaque para os picos de hidrólise e para o pico em bordô referente a cadeia β da insulina não hidrolisada.

As atividades específicas das reações foram calculadas e comparadas, confirmando o resultado visualizado no cromatograma em que houve uma atividade exclusiva de metalopeptidases nos ensaios realizados, uma vez que não houve inibição de atividade utilizando PMSF (Tabela 10). Ao contrário, a área referente ao da cadeia β da insulina está íntegra, o que mostra que não houve degradação da mesma. É importante resaltar que os sinais observados no perfil onde foi adicionado 1-10 fenantrolina são da amostra de proteínas secretadas e não produto de degradação do substrato.

Tabela 10 - Avaliação das atividades enzimática dos extratos de proteínas secretadas por *L. interrogans* e *L. biflexa*, na presença e ausência de inibidores de proteases incubadas com a cadeia beta da insulina e avaliadas por HPLC.

Atividade específica ($\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$)	Controle positivo	PMSF	1-10 fenantrolina
LPF (30 min)	0,26	0,3	0,0
PATOC (6h e 22h)	-	-	-

Inibidor de metalopeptidases (1,10 fenantrolina); inibidor de serinopeptidases (PMSF).

Estes dados confirmam que uma ou mais metaloproteases podem representar candidatos alvo para estratégias de intervenção terapêutica, pois a secreção de proteases por leptospiros patogênicos podem estar potencialmente envolvida nos eventos de invasão e colonização do organismo hospedeiro pelo patógeno.

Com base nestes resultados de atividade proteolítica buscou-se identificar candidatos a partir da análise *in silico* utilizando o banco de dados de busca MEROPS (RAWLINGS et al., 2012).

Foi realizada uma análise das possíveis peptidases presentes no genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni onde foi possível identificar genes preditos como prováveis codificadores de metaloproteases (LIC10857, LIC13434 e LIC10056) cujas proteínas foram identificadas neste trabalho.

Muitos patógenos desenvolveram mecanismos de destruição dos tecidos por proteínas secretadas com atividade proteolítica, além disso, enzimas bacterianas extracelulares agindo direta ou indiretamente afetam a integridade da matriz extracelular (ECM) destruindo o colágeno, laminina, fibronectina e elastina (LÖWER et al., 2008).

5 CONCLUSÕES

Uma característica importante de patógenos microbianos é a mediação de interações entre as células do hospedeiro durante a infecção, sendo provavelmente causadas pela ação de enzimas secretadas com a capacidade de destruir membranas celulares. Proteínas secretadas como enzimas de degradação em bactérias saprófitas e fatores de virulência em bactérias patogênicas são as principais formas de interação entre a bactéria e o ambiente (BRANGER et al., 2001; CARVALHO et al., 2009).

A identificação e posterior caracterização funcional destas proteínas poderão contribuir na elucidação dos mecanismos envolvidos na patogênese e no desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento e a prevenção da leptospirose. Neste sentido, as conclusões deste trabalhos são:

- foi estabelecido um protocolo inédito de obtenção de proteínas secretadas, cuja remoção da albumina proveniente do meio é feita pela lavagem do sedimento bacteriano e posterior secreção em PBS;
- as análises em gel bidimensional foram complementares à técnica de mistura complexa em solução, embora o gel forneça mais informações (visualização, massa experimental e ponto isoelétrico) das proteínas identificadas;
- em relação ao meio de cultivo, o enriquecido com soro de coelho foi mais eficaz quando comparado ao enriquecimento com BSA para o protocolo empregado neste projeto, resultando na identificação de um maior número de proteínas preditas como extracelulares, não citoplasmáticas (com a presença de peptídeo sinal);
- nas amostras avaliadas de *L.interrogans* foram identificadas 159 proteínas diferentes, dentre elas 64 proteínas foram positivas (secretadas) em pelo menos uma das ferramentas de predição utilizadas;
- em *L. biflexa*, foram identificadas 104 proteínas diferentes, dentre elas 43 proteínas positivas pela análise *in silico*;

- em relação à atividade proteolítica, foi verificado que a principal classe de proteínas secretadas nas condições estudadas é metaloprotease, resultado avaliado a partir do uso de inibidores classe específico;
- não foi observada a presença significativa de proteases bacterianas nas amostras de *L. biflexa*.

REFERÊNCIAS*

- ABDALLAH, A. M.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; CHAMPION, P. A.; COX, J.; LUIRINK, J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; APPELMELK, B. J.; BITTER, W. Type VII secretion-mycobacteria show the way. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, n.11, p. 883-891, 2007.
- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, v. 27, n. 140, p. 287-296, 2009.
- ADLER, B.; FAINE, S. Serological and protective-antibody responses of rabbits to leptospiral antigens. **J. Med. Microbiol.**, v. 11, n. 4, p. 401-409, 1978.
- ALEXANDER, A. D. Leptospira. In: BRAUDE, A. I.; DAVIS, C. E.; FIERER, J. **Infectious diseases and medical microbiology**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. Cap.191, p. 1189-1195.
- ANTELMANN, H.; TJALSMA, H.; VOIGT, B.; OHLMEIER, S.; BRON, S. A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. **Genome Res.**, v. 11, n. 9, p. 1484-1502. 2001.
- AREAN, V. M.; JAMES H.; GREEN, M. S. The Pathogenesis of leptospirosis: toxin production by icterohaemorrhagiae. **Am. J. Vet. Res.**, v. 25, p. 836-843, 1963.
- ARNOLD, R.; BRANDMAIER, S.; KLEINE, F.; TISCHLER, P.; HEINZ, E.; BEHRENS, S.; NIINIKOSKI, A.; MEWES, H-W, HORN, M.; RATTEI, T. Sequence-Based Prediction of Type III Secreted Proteins. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 4, p. e.1000376, 2009.
- ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J. F.; NALLY, J.; VERMA, A. Host-inducible immunogenic sphingomyelinase-like protein, Lk73.5, of Leptospira interrogans. **Infect Immun.**, v. 72, n. 2, p. 742-749, 2004.
- ATZINGEN, M. V.; BARBOSA, A. S.; DE BRITO, T.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; LIMA, D. M.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol.**, v. 29, n. 8, p. 70, 2008.
- BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; NEVES, F. O.; ATZINGEN, M. V.; WATANABE, M. M.; VIEIRA, M. L.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO A. L. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 11, p. 6356-6364, 2006.
- BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A. E.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; SILVA, A. S.; DAHA, M. R.; ISAAC, L. Immune Evasion of Leptospira Species by Acquisition of Human Complement Regulator C4BP. **Infect Immun.**, v. 77, n. 3, p. 1137-1143, 2009.

*De acordo com:

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

BARBOSA, A. S.; MONARIS, D.; SILVA, L. B.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CIANCIARULLO, A. M.; ISAAC, L.; ABREU, P. A. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infect Immun.**, v. 78, n. 7, p. 3207-3216, 2010.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. **Microbiologia básica**. São Paulo: Atheneu, 1998. 196 p.

BAROCCHI, M. A.; KO, A. I.; GALVÃO REIS, M.; MCDONALD, K. L.; RILEY, L. W. Rapid Translocation of Polarized MDCK Cell Monolayers by *Leptospira interrogans*, an Invasive but Nonintracellular Pathogen., **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6926-6932, 2012.

BASEMAN, J. B.; COX, C. D. Intermediate energy metabolism of *Leptospira*. **Journal of Bacteriology**, v. 97, n. 3, p. 992-1000, 1969.

BAUMANN, U.; WU, S.; FLAHERTY, K. M.; MCKAY, D. B. Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. **EMBO J.**, v. 12, n. 9, p. 3357-3364, 1993.

BENDTSEN, J. D.; KIEMER, L.; FAUSBOLL, A.; BRUNAK, S. Non-classical protein secretion in bacteria. **BMC Microbiol.**, v. 7, n. 5, p. 58, 2005a.

BENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; WIDDICK, D.; PALMER, T.; BRUNAK, S. Prediction of twin-arginine signal peptides. **BMC Bioinformatics**, v. 6, p. 167, 2005b.

BENNETT, J. C.; HUGHES, C. From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. **Trends Microbiol.**, v. 8, n. 5, p. 202-204, 2000.

BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun.**, v. 57, n. 5, p. 1506-1511, 1989.

BERGMANN, S.; ROHDE, M.; CHHATWAL, G. S.; HAMMERSCHMIDT, S. Alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. **Mol. Microbiol.**, v. 40, n. 6, p. 1273-1287, 2001.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 757-771, 2003.

BIRTALAN, S.; GHOSH, P. Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE. **Nat. Struct. Biol.**, v. 8, n. 11, p. 974-978, 2001.

BlastP - *Standard Protein BLAST*. NCBI - National Library of Medicine, EUA. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 24 jan. 2013.

BRANGER, C.; SONRIER, C.; CHATRENET, B.; KLONJKOWSKI, B.; RUVOEN-CLOUET, N.; AUBERT, A.; ANDRÉ-FONTAINE, G.; ELOIT, M. Identification of the

hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira* interrogans by adenovirus-mediated vaccination. **Infect Immun.**, v. 69, n. 11, p. 6831-6838, 2001.

BRANGER, C.; CHATRENET, B.; GAUVRIT, A.; AVIAT, F.; AUBERT, A.; BACH, J. M.; ANDRÉ-FONTAINE, G. Protection against *Leptospira* interrogans sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein. **Infect Immun.**, v. 73, n. 7, p. 4062-4069, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tabela de casos confirmados por Leptospirose e obtos por Leptospirose. Brasil, grandes regiões.** Brasília, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1562>. Acesso em: 24 jan. 2013.

BRÖMS, J. E.; MEYER, L.; SUN, K.; LAVANDER, M.; SJÖSTED, A. Unique Substrates Secreted by the Type VI Secretion System of *Francisella tularensis* during Intramacrophage Infection. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50473, 2012.

BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. **Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)**, v. 11, n. 3, p. 166-171, 1996.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 73-81, 2002.

BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J.K.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **PNAS**, v. 103, n. 39, p. 14560-14565, 2006.

CARVALHO, E.; BARBOSA, A. S.; GÓMEZ, R. M.; OLIVEIRA, M. L.; ROMERO, E. C.; GONÇALES, A. P.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HO, P. L. Evaluation of the expression and protective potential of *Leptospira* sphingomyelinases. **Current Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 134-142, 2009.

CASCALES, E.; CHRISTIE, P. J. The versatile bacterial type IV secretion systems **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 137-149, 2003.

CASCALES, E. The type VI secretion toolkit. **EMBO Rep.**, v. 9, n. 8, p. 735-741, 2008.

CASH, P. Characterisation of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 372, p. 121-145, 1998.

CIANCIOOTTO, N. P. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. **Trends Microbiol.**, v. 13, n. 12, p. 581-588, 2005.

CHAHINIAN, H.; ALI, Y. B.; ABOUSALHAM, A.; PETRY, S.; MANDRICH, L.; MANCO, G.; CANAAN, S.; SARDA, L. Substrate specificity and kinetic properties of enzymes belonging to the hormone-sensitive lipase family: Comparison with nonlipolytic and lipolytic carboxylesterases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1738, p. 29-36, 2005.

CHRISTIE, P. J.; ATMAKURI, K.; KRISHNAMOORTHY, V.; JAKUBOWSKI, S.; CASCALES, E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 59, p. 451-485, 2005.

CINCO, M.; BANFI, E. Activation of complement by leptospires and its bactericidal activity. **Zentralbl. Bacteriol. Hyg. Abt. I Orig. A.**, v. 254, p. 261–265, 1983.

CINCO, M.; CINI, B.; PERTICARARI, S.; PRESANI, G. *Leptospira interrogans* binds to the CR3 receptor on mammalian cells. **Microb Pathog.**, v. 33, n. 6, p. 299-305, 2002.

CLINE, K.; MCCAFFERY, M. Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery. **EMBO J.**, v. 11, n. 26, p. 3039-3049, 2007.

CORNELIS, G. R. The type III secretion injectisome. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, n. 11, p. 811-825, 2006.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28, p. 291-318, 2004.

CURREEM, S. O. T.; WATT, R. M.; LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y. Two-dimensional gel electrophoresis in bacterial proteomics, **Protein & Cell**, v. 3, n. 5, p. 346-363, 2012.

DAVIDSON, A. L.; DASSA, E.; ORELLE, C.; CHEN, J. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. **Microbiol. Mol. Biol.**, v. 72, n. 2, p. 317–364, 2008.

DE BRITO, T.; FREYMÜLLER, E.; PENNA, D. O.; SANTOS, H. S.; SOARES DE ALMEIDA, S.; GALVÃO, P. A. A.; PEREIRA, V. G. Electron microscopy of the biopsied kidney in human leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 14, p. 397–403, 1965.

DE BRITO, T. On the pathogenesis of the hepatic and renal lesions in leptospirosis. **Rev. Ins. Med. Trop.**, v. 10, n. 4, p. 238-241, 1968.

DE BUCK, E.; LAMMERTYN, E.; ANNÉ, J. The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence. **Trends Microbiol.**, v. 16, n. 9, p. 442-53, 2008.

DE SOUZA, A. I.; NOGUEIRA, J. M.; PEREIRA, M. M. Anti-*Leptospira* antibodies in patients in the State of Mato Grosso do Sul with clinical suspicion of dengue or viral hepatitis. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 40, n. 4, p. 431-435, 2007.

DESVAUX, M.; HEBRAUD, M.; TALON, R.; HENDERSON, R. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. **Cell Trends in Microbiology.**, v. 17, n. 4, p. 139-145, 2004.

DELEPELAIRE, P. Type I secretion in gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, n. 11, p.149-61, 2004.

DOLHNIKOFF, M.; MAUAD, T.; BETHLEM, E. P.; CARVALHO, C. R. R. Pathology and Pathophysiology of Pulmonary Manifestations in Leptospirosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 142-148, 2007.

ESHGHI, A.; CULLEN, P. A.; COWEN, L.; ZUERNER, R. L.; CAMERON, C. E. Global proteome analysis of *Leptospira interrogans*. **J. Proteome Res.**, v. 8, n. 10, p. 4564-4578, 2009.

EYMAN, C.; MACH, H.; HARWOOD, C. R.; HECKER, M. Phosphate-starvation-inducible proteins in *Bacillus subtilis*: a two-dimensional gel electrophoresis study. **Microbiology**, v. 142, p. 3163-3170, 1996.

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

FARR, R. W. Leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 21, p. 1-8, 1995.

GALAN, J. E.; COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**, v. 284, p. 1322-1328, 1999.

GOEBEL, W.; HEDGPETH, J. Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 151, n. 3, p. 1290-1298, 1982.

GONÇALVES, A. J.; DE CARVALHO, J. E.; GUEDES E SILVA, J. B.; et al. Hemoptysis and the adult respiratory distress syndrome as the causes of death in leptospirosis. Changes in the clinical and anatomicopathological patterns. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 25, p. 261-270, 1992.

GOPHNA, U.; RON, E. Z.; GRAUR, D. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. **Gene**, v. 17, n. 312, p. 151-163, 2003.

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

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

HARTH, G.; CLEMENS, D. L.; HORWITZ, M. A. Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: Extracellular release and characterization of its enzymatic activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, p. 9342-9346, 1994.

HARTH, G.; HORWITZ, M. A. Export of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* superoxide dismutase is dependent upon both information in the protein and mycobacterial export machinery. a model for studying export of leaderless proteins by pathogenic mycobacteria. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 7, p. 4281-4292, 1999.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, n. 4, p. 494-501, 2011.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R. C.; ALA'ALDEEN, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, n. 4, p. 692-744, 2004.

HENNEBERRY, R. C.; COX, C. D. Beta-oxidation of fatty acids by *Leptospira*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 16, p. 41-45, 1970.

HAYASHI, S.; WY, H. C. Lipoproteins in Bacteria. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 3, p. 451-471, 1990

HILLER, K.; GROTE, A.; MANECK, M.; MÜNCH, R.; JAHN, D. JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins. **Bioinformatics**, v. 22, p. 2441-2443, 2006.

HIROSE, I.; SANO, K.; SHIODA, I.; KUMANO, M.; NAKAMURA, K.; YAMANE, K. Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two dimensional protein electrophoretic study. **Microbiology**, v. 146, n. 1, p. 65-75, 2000.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: biology, tree-dimensional structures, and biotechnological applications. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; VAN HEUVEL, S.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JEFFERY, C.J. Moonlighting proteins. **Trends Biochem Sci.**, v. 24, n. 1, p. 8-11, 1999.

JOHNSON, R. C.; ROGERS, P. Metabolism of leptospirae: Utilization of amino acids and purine, and pyrimidine bases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 107, n. 3, p. 459-470, 1964.

JOHNSON, R. C.; WALBY, J. K. Cultivation of leptospires: fatty acid requirements, **Applied Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 1027-1028, 1972.

LEE, S. H.; CHOI, J. I.; PARK, S. J.; LEE, S.Y.; PARK, B. C. Display of bacterial lipase on the *Escherichia coli* cell surface by using FadL as an anchoring motif and use of the enzyme in enantioselective biocatalysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 7, p. 5074-5080, 2004.

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

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

LEININGER, E.; ROBERTS, M.; KENIMER, J. G.; CHARLES, I. G.; FAIRWEATHER, N.; NOVOTNY P, BRENNAN M. J. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, n. 2, p. 345-349, 1991.

LINDEBERG, M.; BOYD, C. M.; KEEN, N. T.; COLLMER, A. External loops at the C terminus of *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase C are required for species-specific secretion through the out type II pathway. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 6, p. 1431-1437, 1998.

LOMAR, A.V.; DIAMENT, D.; TORRES, J. R. Leptospirosis in Latina America. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 14, n. 1, p. 23-39, 2000.

LÖWER, M.; WEYDIG, C.; METZLER, D.; REUTER, A.; STARZINSKI-POWITZ, A.; WESSLER, S.; SCHNEIDER, G. Prediction of extracellular proteases of the human pathogen *Helicobacter pylori*: reveals proteolytic activity of the Hp1018/19 Protein HtrA. **PloS One**, v. 3, n. 10, p. e3510, 2008.

LUKS, A M.; LAKSHMINARAYANAN, S.; HIRSCHMANN, J. V. Leptospirosis presenting as diffuse alveolar hemorrhage: case report and literature review. **Chest**, v. 123, p. 639-643, 2003.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol. Microbiol.**, v. 49, n. 4, p. 929-945, 2003.

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

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect Dis.**, v. 18, n. 5, p. 376-386, 2005.

MCDERMOTT, J. E.; CORRIGAN, A.; PETERSON, E.; OEHMEN, C.; NIEMANN, G.; CAMBRONNE, E. D.; SHARP, D.; ADKINS, J. N.; SAMUDRALA, R.; HEFFRON, F. Computational prediction of type III and IV secreted effectors in gram-negative bacteria. **Infect Immun.**, v. 79, n. 1, p. 23-32, 2011.

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.; TRUCCOLO, J.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 1, n. 185, p. 17-22, 2000.

MEROPS: RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. 343-350, 2012.

MILLER, N. G.; ALLEN, J. E.; WILSON, R. B. The pathogenesis of hemorrhage in the lung of the hamster during acute leptospirosis. **Med. Micr. Immun.** v. 160, n. 4, p. 263-278, 1974.

MONAHAN, A. M.; MILLER, I. S.; NALLY, J. E. Leptospirosis: risks during recreational activities. **J. Appl. Microbiol.**, v. 107, n. 3, p. 707-716, 2009.

MOTA, L. J.; CORNELIS, G. R. The bacterial injection kit: type III secretion systems. **Ann. Med.**, v. 37, n. 4, p. 234-249, 2005.

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

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

OMORI, K.; IDEI, A.; AKATSUKA, H. Serratia ATP-binding cassette protein exporter, Lip, recognizes a protein region upstream of the C terminus for specific secretion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 29, p. 27111-27119, 2001.

PAES LEME, A. F.; SHERMAN, N. E.; SMALLEY, D. M.; SIZUKUSA, L. O.; OLIVEIRA, A. K.; MENEZES, M. C.; FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Hemorrhagic activity of HF3, a snake venom metalloproteinase: insights from the proteomic analysis of mouse skin and blood plasma. **J. Proteome Res.**, v. 11, n. 1, p. 279-291, 2012.

PALANIAPPAN, R. U. M.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; CHEN, C. S.; PAN, M. J.; MATSUMOTO, M.; CHANG, Y. F. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 3, p. 1745-1750, 2006.

PAPANIKOU, E.; KARAMANOU, S.; ECONOMOU, A. Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, n. 11, p. 839-851, 2007.

PATEL, V.; GOLDBERG, H.S.; BLENDEN, D. Characterization of leptospiral lipase. **Journal of Bacteriology**, v.88, n.4, p.877-884, 1964.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; HEIJNE3, G. V.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v, 8, p. 785–786, 2011.

PICARDEAU, M.; BULACH, D.M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R.L.; ZIDANE, N.; WILSON, P.J.; CRENO, S.; KUCZEK, E.S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J.C.;

MCGRATH, A.; JOHNSON, M.J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R.L.; ROOD, J.I.; LAJUS, A.; DAVIES, J.K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One.**, v. 13, n. 3 (2), p.e1607, 2008.

PSORTb 3.0: YU, N. Y.; WAGNER, J. R.; LAIRD, M. R.; MELLI, G.; REY, S.; LO, R.; DAO, P.; SAHINALP, S.C.; ESTER, M.; FOSTER, L.J.; BRINKMAN, F.S.L. PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes, **Bioinformatics**, v. 26, n. 13, p. 1608-1615, 2010. Disponível em: < <http://www.psорт.org/psортb/>>. Acesso em: 24 jan. 2013.

POQUET, I.; FAUCHER, D.; PUGSLEY, A. P. Stable periplasmic secretion intermediate in the general secretory pathway of *Escherichia coli*. **EMBO J.**, v. 12, n. 1, p. 271-278, 1993.

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

REN, S.X.; FU, G.; JIANG, X.G.; ZENG, R.; MIAO, Y.G.; XU, H.; ZHANG, Y.X.; XIONG, H.; LU, G.; LU, L.F.; JIANG, H.Q.; JIA, J.; TU, Y.F.; JIANG, J.X.; GU, W.Y.; ZHANG, Y.Q.; CAI, Z.; SHENG, H.H.; YIN, H.F.; ZHANG, Y.; ZHU, G.F.; WAN, M.; HUANG, H.L.; QIAN, Z.; WANG, S.Y.; MA, W.; YAO, Z.J.; SHEN, Y.; QIANG, B.Q.; XIA, Q.C.; GUO, X.K.; DANCHIN, A.; SAINT GIRONS, I.; SOMERVILLE, R.L.; WEN, Y.M.; SHI, M.H.; CHEN, Z.; XU, J.G.; ZHAO, G.P. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 24, n. 422, p. 888-893, 2003.

RISTOW, P.; BOURH, P.; KERNEIS, S.; SCHMITT, C.; PREVOST, M. C.; LILENBAUM, W.; PICARDEAU, M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 1309-1317, 2008.

ROGGENKAMP, A.; ACKERMANN, N.; JACOBI, C.A.; TRUELZSCH, K.; HOFFMANN, H.; HEESEMANN, J. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 13, p. 3735-3744, 2003.

SAMUDRALA, R.; HEFFRON, F.; MCDERMOTT, J. E. Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000375, 2009.

SCHAUMBURG, S.; DIEKMANN, O.; HAGENDORFF, P.; BERGMANN, S.; ROHDE, M.; HAMMERSCHMIDT, S.; JEFFERY, C. J.; JÄNSCH, L.; WEHLAND, J.; KÄRST, U. The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. **Proteomics**, v. 4, p. 2991-3006, 2004.

SecretomeP 2.0: Bendtsen, J. D.; Kiemer, L.; Fausboll, A.; Brunak, S. Non-classical protein secretion in bacteria. **BMC Microbiology**, v.5, p. 58, 2005. Disponível em: < <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>>. Acesso em: 24 jan. 2013.

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

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

SHORTRIDGE, V. D.; LAZDUNSKI, A.; VASIL, M. L. Osmoprotectants and phosphate regulate expression of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 863-87, 1992.

SHRIVASTAVA, S.; MANDE, S. S. Identification and functional characterization of gene components of Type VI Secretion system in bacterial genomes. **PLoS One**, v. 3, n. 3, p. e2955, 2008

SignalP 4.0: PETERSEN, T. N.; GUNNAR VON HEIJNE, S. B.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, p. 785-786, 2011. Disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>> Acesso em: 24 jan. 2013.

SONRIER, C.; BRANGER, C.; MICHEL, V.; RUVOËN-CLOUET, N.; GANIÈRE, J. P.; ANDRÉ-FONTAINE, G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. **Vaccine**, v. 19, n. 1, p. 86-94, 2000.

TatP 1.0: Prediction of twin-arginine signal peptides. Bendtsen, J. D.; Nielsen, H.; Widdick, D.; Palmer, T.; Brunak, S. **BMC bioinformatics**, v. 6, p. 167, 2005. Disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>> Acesso em: 24 jan. 2013.

THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 12, n. 4, p. 420-430, 2000.

THONGBOONKERD, V.; CHIANGJONG, W.; SAETUN, P.; SINCHAIKUL, S.; CHEN, S. T.; KOSITANONT, U. Analysis of differential proteomes in pathogenic and non-pathogenic *Leptospira*: potential pathogenic and virulence factors. **Proteomics**, v. 9, n. 13, p. 3522-3534, 2009.

TRUEBA, G.; ZAPATA, S.; MADRID, K.; CULLEN, P.; HAAKE, D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **Int. Microbiol.**, v. 7, n. 1, p. 35-40, 2004.

TSENG, T. T.; TYLER, B. M.; SETUBAL, J. C. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. **BMC Microbiol.**, v. 9, p. S2, 2009. Suppl. 1.

VASCONCELLOS, S. A. O papel dos reservatórios na manutenção da leptospirose na natureza. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 11, n. 1, p. 17-24, 1987.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 14, n. 5, p. 527-538, 2001.

VITIKAINEN, M.; LAPPALAINEN, I.; SEPPALA, R.; ANTELMANN, H.; BOER, H.; TAIRA, S.; SAVILAHTI, H.; HECKER, M.; VIHINEN, M.; SARVAS, M.; KONTINEN, V.P. Structure-function analysis of prsa reveals roles for the parvulin-like and flanking n- and c-terminal domains in protein folding and secretion in *Bacillus subtilis*. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 18, p. 19302-19314, 2004.

WANDERSMAN, C.; DELEPELAIRE, P.; LE´TOFFÉ, S.; SCHWARTZ, M. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* extracellular proteases: cloning and expression of the protease genes in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 169, n. 11, p. 5046-5053, 1987.

WANG, Z.; JIN, L.; WEGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microb. Cell Fact.**, v. 11, n. 6, p. 39, 2007.

WAKSMAN, G.; HULTGREN, S. J. Estrutura e montagem mecanismo de acompanhante inaugurar-pili. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, p. 703-714, 2009.

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

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

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

ZHANG, Y. X.; GENG, Y.; YANG, J. W.; GUO, X. K.; ZHAO, G. P. Cytotoxic activity and probable apoptotic effect of Sph2, a sphingomyelinase hemolysin from *Leptospira interrogans* strain Lai. **BMB Rep.**, v. 29, n. 41, p. 119-125, 2008.

APÊNDICE A - Listas de proteínas identificadas a partir dos géis bidimensionais

Tabela A1 - Lista das proteínas identificadas no gel bidimensional de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (GEL A). (continua)

ID	Número do acesso	Nomenclatura do gene	Teórico		Experimental		Análise <i>In Silico</i>				ANOTAÇÃO GENOMA
			Massa (Da)	pI	Score	Matches	Secretome V.2.0	SignalP V. 4.0	TatP V. 1.0	PSORTb V 3.0	
A3	gi 45656973	LIC11089	33366	5.03	55	3(3)	+ (0.85)	-	-	ND	Hypothetical protein
A4	gi 45658297	LIC12454	13194	5.43	427	8(5)	-	-	-	C (9.97)	Response regulator
A5	gi 45656248	LIC10344	9518	5.15	154	5(2)	-	-	-	ND	Anti-sigma factor antagonist
A6	gi 45658174	LIC12326	14142	4.51	594	18(16)	+ (0.77)	-	-	ND	Hypothetical protein
A7	gi 45656214	LIC10310	13987	4.68	83	2(0)	+(0.61)	-	-	ND	Glycine cleavage system protein H
A8	gi 45658007	LIC12158	27529	6.09	136	4(1)	-	-	-	C (9.97)	Hydroxyacid aldolase
A9	gi 45656336	LIC10437	56621	5.89	309	9(2)	-	-	-	CM (9.99)	Spermidine synthase
A10	gi 45657540	LIC11672	28472	6.86	151	3(2)	-	-	-	C (9.97)	Enoyl-CoA hydratase
A11	gi 45657414	LIC11541	31818	6.96	278	8(1)	-	-	-	C (9.97)	2-dehydro-3-
A17					77	1(1)					deoxyphooctonate aldolase
A12	gi 45657553	LIC11687	34830	9.16	539	8(6)	-	-	-	ND	Endonuclease - S1/P1
A42	gi 45657213	LIC11335	57811	5.29	132	14(1)	-	-	-	C (9.97)	Chaperonin GroEL
A43					300	33(9)					
A44					847	35(32)					
A45					244	11(11)					

Tabela A1 - Lista das proteínas identificadas no gel bidimensional de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (GEL A).

(continuação)

A46					497	15(14)						Chaperonin GroEL
A47					1278	41(40)						
A48					902	50(37)						
A49					108	13(5)						
A50					1823	78(70)						
A 16	gi 45659286	LIC13470	34773	7.68	658	39(10)	-	-	-	CM (7.88)	Ferredoxin--NADP reductase	
A19	gi 161621774	LIC11781	34787	5.91	275	13(6)	+	-	-	ND	Malate dehydrogenase	
A21					200	5(1)	(0.85)					
A20	gi 45656733	LIC10842	33249	6.62	255	11(3)	+	-	-	C (9.26)	Dihydrodipicolinate synthase	
							(0.67)					
A22	gi 304570499	LIC12323	35003	6.25	538	11(4)	+	-	-	C (9.96)	3-oxoacyl- (acyl-carrier-protein) synthase	
							(0.56)					
A23	gi 45657078	LIC11194	36931	6.07	528	12(2)	-	-	-	C (8.96)	Citrate lyase	
A24	gi 45658082	LIC12233	37846	6.71	602	35(7)	-	-	-	ND	DhnA-type fructose-1,6-	
A25					665	12(6)					bisphosphate aldolase	
A27	gi 45659137	LIC13318	42332	6.07	792	21(9)	+	-	-	ND	Fatty acid synthase subunit beta	
							(0.89)					
A28	gi 45659065	LIC13244	44631	6.34	789	17(6)	-	-	-	C (8.96)	[Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase	
A29	gi 45657237	LIC11359	43904	6.77	484	12(4)	-	-	-	C (8.96)	Hypothetical protein	

Tabela A1 - Lista das proteínas identificadas no gel bidimensional de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (GEL A).

conclusão)

A31	gi 45658181	LIC12335	44843	7.72	158	5(0)	+	-	-	C (9.97)	Serine hydroxymethyltransferase
							(0.59)				
A32	gi 45658317	LIC12475	50086	6.66	152	14(2)	-	-	-	C (9.97)	dihydrolipoamide dehydrogenase
A33	gi 45656121	LIC10216	59044	6.77	236	10(3)	-	-	-	C (9.97)	phosphoenolpyruvate
A34					77	5(0)					carboxykinase
A36	gi 45658468	LIC12631	70832	6.01	74	2(1)	+	-	-	EX (9.71)	Hemolisin
							(0.94)				
A37	gi 45657338	LIC11463	41243	7.82	252	15(3)	-	-	-	EX (9.71)	Putative esterase/lipase
A38					555	15(3)					
A39	gi 45657752	LIC11889	31127	9.02	419	6(4)	-	-	-	P (10.0)	Flagellin protein
A40	gi 45657753	LIC11890	31174	6.54	566	31(12)	-	-	-	P (10.0)	Flagellin protein (conclusão)
A41	gi 45657404	LIC11531	31340	7.04	364	7(3)	-	-	-	P (10.0)	Flagellin protein
A49	gi 45656765	LIC10874	112541	6.62	622	6(2)	+	-	-	CM (9.82)	Molybdopterin-Binding (MopB)
							(0.94)				
A51	gi 45658253	LIC12407	52976	5.90	501	11(5)	-	-	-	C (9.97)	Glutamine synthetase
A52					296	7(1)					
A53	gi 45656816	LIC10927	54300	8.15	493	12(6)	+	-	-	EX (9.64)	Lipoprotein_Pectinacetyl esterase
							(0.93)				
A54	gi 45657102	LIC11219	21386	5.80	241	6(1)	-	-	-	C (9.96)	Peroxisredoxin

Tabela A2 - Listas das proteínas identificadas no gel bidimensional de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (GEL B). (continua)

ID	Número do acesso	Nomenclatura do gene	Teórico		Experimental		Análise In Silico				ANOTAÇÃO GENOMA
			Massa (Da)	pI	Score	Matches	Secretome V.2.0	SignalP V. 4.0	TatP V. 1.0	PSORTb V 3.0	
B27	gi 45658083	LIC12234	19178	5.35	27	2(1)	-	-	-	EX (9.45)	Hypothetical protein
B4 B9	gi 45656436	LIC10538	60895	5.21	22 37	2(2)	-	-	-	C (9.97)	ABC transporter ATP-binding protein
B36	gi 45657379	LIC11504	31389	9.01	39	2(2)	-	-	-	EX (9.45)	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase
B7	gi 45656605	LIC10707	54740	5.22	24	1(1)	-	-	-	CM (9.82)	Hypothetical protein
B14	gi 45655821	LIC20245	25660	5.63	23	1(1)	-	-	-	C (9.96)	Hypothetical protein
B17 B40	gi 45658827	LIC13000	33135	9.18	24 19	1(1) 2(1)	-	-	-	C (9.96)	PPIC-type PPIASE domain

Tabela A2 - Listas das proteínas identificadas no gel bidimensional de *L. interrogans* sorovar *kennewicki* estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (GEL B).

(conclusão)

B18	gi 45658053	LIC12204	41836	7.01	28	1(1)	-	-	-	ND (MS*)	FAD-dependent oxidoreductase
B19	gi 45657338	LIC11463	41580	5.88	33	4(2)	-	-	-	Ex	Esterase_lipase
B20					83	7(4)				(9.52)	
B22	gi 45658468	LIC12631	71209	6.20	83	7(3)	+ (0.94)	-	-	EX	Hemolysin
B23					249	10(1)				(9.71)	
B24					149	12(6)					
B25					77	11(6)					
B29					30	1(1)					
B30					65	9(3)					
B31	gi 45655978	LIC10064	17925	8.99	53	4(2)	+ (0.82)	+	-	NC (MS*)	Hypothetical protein
B38	gi 45659173	LIC13354	27898	9.08	220	11(9)	+	-	-	ND	Hypothetical protein
B39					297	14(12)	(0.85)				

Tabela A3 - Lista das proteínas identificadas no gel bidimensional de *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (GEL C). (continua)

ID	Número do acesso	Nomenclatura do gene	Teórico		Experimental		Análise <i>In Silico</i>				ANOTAÇÃO DO GENOMA
			Massa (DA)	pI	Score	Matches	Secretome V.2.0	SignalP V. 4.0	TatP V. 1.0	PSORTb V 3.0	
C3	gi 183220671	LEPBI_I1281	122573	5.24	109	6(0)	-	+	-	NC (MS)	Carbamoyl phosphate synthase large subunit
C4	gi 183220549	LEPBI_I1153	78677	5.40	205	11(0)	-	-	-	C (9.97)	Elongation factor G C-terminus.
C5					394	27(3)					
C6					450	27(3)					
C19					58	6(0)					
C7	gi 183222685	LEPBI_I3341	59176	5.63	62	1(1)	-	-	-	ND (MS)	Peptidase
C8	gi 183221818	LEPBI_I2449	88721	5.69	149	8(0)	-	-	-	C	chaperone ClpB
C9					177	12(0)					
C10	gi 189913417	LEPBI_II0249	81000	6.25	137	6(0)	+	-	-	C	
C11					163	8(0)	(0.86)				
C12					265	10(1)					
C13					434	22(1)					
C14											

Tabela A3 - Lista das proteínas identificadas no gel bidimensional de *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (GEL C).

(continuação)

C38	gi 183222336	LEPBI_I2989	59217	6.48	88	6(1)	+	-	-	C	phosphoenolpyruva
C39					233	12(1)	(0.73)				te carboxykinase
C40					340	21(7)					
C41					332	20(4)					
C15	gi 183219916	LEPBI_I0498	61268	5.85	229	14(3)	-	-	-	C	Phospho
C17					95	2(2)					glyceromutase
C18	gi 183220655	LEPBI_I1264	36046	4.79	55	2(1)	-	+	-	p	ABC transporter periplasmic adhesin
C20	gi 183220383	LEPBI_I0979	74306	5.63	86	4(0)	-	-	-	C	Oligopeptidase A
C21	gi 183221002	LEPBI_I1615	67056	5.76	270	11(5)	-	-	-	C	GMP synthase
C22					150	11(4)					
C23					65	3(0)					
C24					124	5(3)					
C25					58	7(2)					
C26					270	11(5)					
C27					308	18(6)					
C28					125	11(1)					
					59	3(1)					

Tabela A3 - Lista das proteínas identificadas no gel bidimensional de *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (GEL C). (conclusão)

C31	gi 183219916	LEPBI_I1529	75813	5.66	85	5(0)	-	-	-	C	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase
C32					79	3(1)					
C29	gi 183221715	LEPBI_I2344	57978	5.35	248	11(2)	-	-	-	C	GroEL
C30					459	19(1)					
C33	gi 183221231	LEPBI_I1845	54674	5.57	181	9(0)	-	-	-	C	2-isopropylmalate synthase
C36	gi 183220175	LEPBI_I0764		5.77	195	5(1)	-	-	-	C	Piruvato quinase
C39	gi 183220856	LEPBI_I1469	56364		73	3(0)	-	-	-	C	bifunctional phosphoribosylamin oimidazole carboxamide
C42	gi 183221211	LEPBI_I1825	47216	5.24	79	7(0)	-	-	-	C	Histidinol dehydrogenase

Tabela A4 - Listas das proteínas identificadas no gel bidimensional de *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (GEL D).

(continua)

ID	Número do acesso	Nomenclatura do gene	Teórico		Experimental		Análise <i>In Silico</i>				ANOTAÇÃO GENOMA	DO
			Massa (Da)	pI	Score	Matches	Secretome 2.0	Signal P 4.0	TatP 1.0	PSORTb V 3.0		
D3	gi 189913417	LEPBI_II0249	81000	6.25	619	17(6)	+ (0.86)	-	-	C	Aconitato Hidratase	
D5					479	15(5)				(9.97)		
D4	gi 183220549	LEPBI_I1153	78677	5.40	849	25(8)	-	-	-	C	Fator de Elongação G	
										(9.97)		
D6	gi 183220383	LEPBI_I0979	74306	5.63	84	4(0)	-	-	-	C	Oligopeptidase A	
										(9.97)		
D7	gi 183221002	LEPBI_I1615	67056	5.76	1022	30(12)	-	-	-	C	Guanine	
D8					947	24(11)				(9.97)	monphosphate	
D9					758	26(9)					synthetase	
D11	gi 183221715	LEPBI_I2344	57978	5.35	241	9(3)	-	-	-	C	Chaperonina GroEL	
										(9.97)		
D10	gi 183219916	LEPBI_I0498	61268	5.66	236	8(1)	-	-	-	C	Fosfoglicomutase	
										(9.97)	sulfatase	

Tabela A4 - Listas das proteínas identificadas no gel bidimensional de *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, crescida em meio EMJH – enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (GEL D). (continuação)

D12	gi 183222336	LEPBI_I2989	59217	6.48	645	21(6)	+	-	-	C (9.97)	Fosfoenolpiruvato
D14					648	19(4)	(0.73)				carboxiquinase
D13	gi 183221280	LEPBI_I1897	56958	5.25	336	9(3)	-	-	-	C (10.0)	Lisina-tRNA sintetase.
D16	gi 183220372	LEPBI_Ia0966	50633	5.20	526	24(4)	+ (0.88)	-	-	C (8.96)	Fator desencadeante 1
D15	gi 183221095	LEPBI_I1709	49896	4.98	209	6(2)	+ (0.85)	-	-	C (9.97)	Provável Protease PmbA
D17	gi 183220119	LEPBI_I0707	47177	5.67	533	15(5)	-	-	-	C (9.97)	Provável Acetil- CoA acetiltransferase
D18	gi 183220016	LEPBI_I0599	47709	8.47	240	7(2)	-	-	-	C (9.26)	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase FadB
D19	gi 183222240	LEPBI_I2891	44862	6.29	684	22(5)	-	-	-	ND	Isocitrato-
D20					521	13(6)				(MS*)	desidrogenase
D21					1155	28(12)					
D22					1155	28(12)					
D45					551	12(5)					

Tabela A4 - Listas das proteínas identificadas no gel bidimensional de *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, crescida em meio EMJH — enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (GEL D). (continuação)

D23	gi 183221349	LEPBI_I1966	43794	5.74	570	12(4)	-	-	-	C (9.97)	Fator de elongação Tu
D25					116	2(1)					
D26					351	14(4)					
D34					575	20(6)					
D35					481	18(7)					
D36					594	21(11)					
D24	gi 183220196	LEPBI_I0786	43896	6.77	262	8(1)	+ (0.78)	-	-	ND	Provável Acil-desidratase
D37	gi 183220853	LEPBI_I1466	23251	5.30	781	28(8)	-	-	-	C (9.97)	Provável translocase
D27	gi 183221804	LEPBI_I2435	36985	6.10	617	24(7)	-	-	-	C (8.96)	Provável Malato sintetase
D38	gi 183219454	LEPBI_I0027	21154	6.22	563	16(8)	+ (0.92)	-	-	P (9.44)	Superoxido desmutase
D28	gi 183220863	LEPBI_I1476	36353	9.26	582	22(5)	-	+	-	P (9.76)	Proteína periplasmática ligada ao sistema transportador ABC
D29	gi 183220558	LEPBI_I1162	32528	8.58	237	7(2)	-	-	-	C (9.97)	Cisteína sintetase A
D30	gi 189913277	LEPBI_II0106	30784	5.87	383	18(4)	-	-	-	C (9.97)	Espermidina sintase

Tabela A4 - Listas das proteínas identificadas no gel bidimensional de *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (GEL D). (conclusão)

D32	gi 183220531	LEPBI_I1133	27187	5.34	529	12(6)	-	-	-	C (8.96)	Flavoproteína de transferência de elétrons
D31	gi 183220847	LEPBI_I1460	42784	5.79	453	13(4)	+	-	-	C (0.82) (8.96)	Proteína hipotética
D33	gi 189913316	LEPBI_II0146	21867	5.96	610	17(8)	+	-	-	C (0.91) (9.26)	Peroxirredoxinas
D39	gi 183221710	LEPBI_I2338	18436	6.18	428	16(2)	-	-	-	C (8.96)	Provável Proteína ligada ao AMP-cíclico
D40	gi 183220390	LEPBI_I0986	27070	6.78	255	15(1)	+	+	-	NC (0.85)	Proteína hipotética
D41	gi 183222534	LEPBI_I3189	14040	4.58	99	1(1)	+	-	-	ND (0.89)	Proteína H, sistema clivagem de glicina
D42	gi 183222510	LEPBI_I3165	16816	5.77	327	10(3)	-	-	-	C (8,96)	Proteína hipotética
D43	gi 183221001	LEPBI_I1614	15212	5.75	226	9(1)	-	-	-	ND	7-ciano-7-deazaguanina redutase
D44	gi 183219592	LEPBI_I0167	11520	6.32	187	4(2)	-	-	-	C (8.96)	Proteína hipotética

APÊNDICE B - Listas de proteínas identificadas a partir das análises de amostras complexas em solução

Tabela B1 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1)

(continua)

ID	Número do acesso	Nomenclatura do gene	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>							ANOTAÇÃO DO GENOMA	
			Massa (Da)	Score	Matches	Secretome 2.0	Signal P 4.0	TatP 1.0	PSORTb V 3.0		
1	gi 45657213	LIC11335	57963	2261	36(33)	-	-	-	C	GroEL	
2	gi 45656176	LIC10272	79415	978	21(19)	-	-	-	C	elongation factor G	
3	gi 45658253	LIC12407	53421	870	18(18)	-	-	-	C	Glutamine synthetase	
4	gi 45658676	LIC12846	36722	852	12(12)	-	-	-	C	DNA-directed polymerase subunit alpha	RNA
5	gi 45656096	LIC10191	20958	672	7(7)	+ (0.91)	+	-	NC	Loa22, lipoprotein	OmpA-like
6	gi 45657831	LIC11978	11536	586	10(10)	-	-	-	C	thioredoxin	

Tabela B1 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1).
(continuação)

7	gi 45657230	LIC11352	29652	549	8(8)	+	+	-	NC	LipL32
						(0.92)				
8	gi 45658705	LIC12875	43662	534	7(7)	-	-	-	C	Elongation factor EF-Tu
9	gi 45656646	LIC10752	12800	527	12(10)	-	+	-	NC	50S Ribosomal protein L7/L12
10	gi 45600887	LIC11781	32294	513	10(10)	+	-	-	ND	malate dehydrogenase
						(0.85)				
11	gi 45658659	LIC12829	48497	492	6(6)	-	-	-	C	Citrate synthase
12	gi 45659186	LIC13367	62719	459	11(11)	-	-	-	C	sulfite reductase subunit beta
13	gi 45656423	LIC10525	24217	426	5(5)	+	-	-	C	heat shock protein GrpE
						(0.67)				
14	gi 45658793	LIC12966	39088	400	6(6)	+	+	-	NC	LipL41
						(0.84)				
15	gi 45658082	LIC12233	38128	369	6(6)	-	-	-	ND	fructose-bisphosphate aldolase

Tabela B1 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1).

(continuação)										
16	gi 45657078	LIC11194	37212	368	9(9)	-	-	-	C	Pyruvate kinase (PK)
17	gi 45656311	LIC10411	17233	308	7(7)	-	+	-	NC (MS)	hypothetical protein
18	gi 45656648	LIC10754	158164	289	6(4)	-	-	-	C	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'
19	gi 45657656	LIC11790	44359	239	9(9)	-	-	-	C	Aspartate aminotransferase
20	gi 45656121	LIC10216	59543	230	7(6)	-	-	-	C	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
21	gi 45655916	LIC10002	41533	199	6(4)	-	-	-	C	DNA polymerase III subunit beta
22	gi 45656218	LIC10314	63757	198	6(4)	-	+	-	NC (MS)	hypothetical protein
23	gi 45657214	LIC11336	10556	193	5(5)	-	-	-	C	co-chaperonin GroES
24	gi 45656243	LIC10339	95362	179	4(2)	-	-	-	C	hemolysin B
25	gi 45657102	LIC11219	21619	179	7(5)	-	-	-	C	Thioredoxin

Tabela B1 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1).
(continuação)

26	gi 45656213	LIC10309	107127	177	2(2)	-	-	-	C	glycine dehydrogenase
27	gi 45657697	LIC11834	34777	175	3(3)	+	-	-	C	lipoprotein
						(0.68)				
28	gi 45657190	LIC11310	21077	169	4(4)	-	-	-	C	bacterioferritin
29	gi 45655666	LIC20083	48667	161	10(3)	-	-	-	C	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase
30	gi 45655648	LIC20065	8497	153	6(6)	-	-	-	C	acyl carrier protein
31	gi 45658174	LIC12326	14264	151	3(3)	+	-	-	ND	hypothetical protein
						(0.77)				
32	gi 45658643	LIC12812	41148	150	2(2)	-	-	-	P	serine protease MucD
33	gi 45656890	LIC11003	62106	141	5(4)	+	+	-	ME	LipL71
						(0.93)				
34	gi 45658458	LIC12621	14514	132	4(4)	-	-	-	C	hypothetical protein
35	gi 45658886	LIC13060	38119	127	2(2)	+	+	-	ND	LipL36
						(0.95)				

Tabela B1 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1).

										(continuação)
36	gi 45655647	LIC20064	26221	126	2(2)	-	-	-	C	3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase
37	gi 45657938	LIC12090	36915	126	4(3)	-	-	-	C	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
38	gi 45655776	LIC20196	19644	124	4(2)	-	-	-	ND	hypothetical protein
39	gi 45658297	LIC12454	13317	123	2(2)	-	-	-	C	response regulator
40	gi 45658753	LIC12925	48553	122	3(3)	-	-	-	C	Citrate synthase
41	gi 45656816	LIC10927	54976	117	1(1)	+	-	-	EX	lipoprotein Pectinacylesterase
						(0.92)				
42	gi 45657553	LIC11687	35229	112	1(1)	+	-	-	ND	endonuclease
						(0.62)				
43	gi 45657258	LIC11380	30852	109	2(2)	-	-	-	C	RNA polymerase sigma-28 factor
44	gi 45656422	LIC10524	69173	105	2(2)	+	-	-	C	chaperone DnaK
						(0.52)				
45	gi 45657374	LIC11499	9054	105	2(2)	+	-	-	ND	hypothetical protein
						(0.92)				

Tabela B1 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1).

46	gi 45658540	LIC12705	95033	104	4(2)	+	-	-	C	(continuação)	
						(0.86)				Initiation Factor 2 (IF2)	
47	gi 45657748	LIC11885	44803	103	4(2)	+	-	-	ND	Putative lipoprotein	
						(0.92)					
48	gi 45656744	LIC10853	20588	102	2(2)	-	-	-	C	Ribosome recycling factor	
49	gi 45656504	LIC10606	19712	100	1(1)	-	-	-	C	DNA-binding protein	stress
50	gi 45656742	LIC10851	22346	98	2(2)	-	-	-	C	Elongation factor	TS
51	gi 45657830	LIC11977	82763	95	3(3)	-	-	-	C	cyclic nucleotide binding protein	
52	gi 45657317	LIC11441	17997	94	2(2)	+	-	-	ND	hypothetical protein	
						(0.82)					
53	gi 45657930	LIC12082	33228	94	3(2)	-	-	-	C	Tryptophan synthase	
54	gi 45657292	LIC11416	52171	90	2(2)	-	-	-	C	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	
55	gi 45657939	LIC12091	42975	90	2(2)	-	-	-	C	Phosphoglycerate kinase	

Tabela B1 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1).

(continuação)

56	gi 45657174	LIC11294	78454	87	4(1)	-	-		MC	hypothetical protein
57	gi 45659286	LIC13470	35056	86	3(3)	-	-	-	MC	Ferredoxin reductase
58	gi 45656891	LIC11004	12432	85	3(3)	-	-	-	ND	Anti-sigma factor antagonist
59	gi 45657810	LIC11951	21737	81	1(1)	-	-	-	C	Caseinolytic (ClpP) protease
60	gi 45657522	LIC11652	23649	81	2(2)	-	-	-	C	Translaldolase
61	gi 45657869	LIC12017	96324	73	2(1)	-	-		C	ATP-dependent protease
62	gi 45656736	LIC10845	38832	71	2(2)	+	-	-	ND	hypothetical protein
						(0.87)				
63	gi 45657838	LIC11985	10145	66	2(1)	-	-	-	C	RNA-binding
64	gi 45659173	LIC13354	27898	66	1(1)	+	-	-	ND	hypothetical protein
						(0.85)				
65	gi 45656658	LIC10764	18411	64	3(1)	-	-	+	C	nucleotide-binding

Tabela B1 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1).

66	gi 45659065	LIC13244	44908	62	2(2)	-	-	-	C	(continuação) Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase
67	gi 45656263	LIC10360	32832	61	1(1)	+	-	-	ND	electron transfer flavoprotein
68	gi 45655785	LIC20205	32125	61	2(2)	+	-	-	ND	Ferritin-like superfamily
69	gi 45656562	LIC10664	18843	59	1(1)	-	-	-	ND	hypothetical protein
70	gi 45656264	LIC10361	27051	59	1(1)	-	-	-	C	Adenine nucleotide alpha hydrolases
71	gi 45656647	LIC10753	138029	56	7(5)	-	-	-	C	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
72	gi 45658181	LIC12335	45120	55	3(1)	+	-	-	C	serine hydroxymethyltransferase
73	gi 45657597	LIC11731	17842	55	6(4)	-	-	-	C	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
74	gi 45657515	LIC11643	42321	55	1(1)	+	-	-	C	LipL45
75	gi 45657307	LIC11431	18249	53	4(2)	-	-	-	C	cyclic nucleotide binding protein

Tabela B1 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1).

(continuação)										
76	gi 45658541	LIC12706	50978	51	2(1)	-	-	-	C	transcription elongation factor NusA
77	gi 45656339	LIC10440	12754	48	2(2)	-	-	-	MC	nitrogen regulatory protein PII
78	gi 45658914	LIC13088	24562	47	2(1)	-	-	-	C	Signal receiver domain;
79	gi 45655824	LIC20249	82338	45	4(2)	+	-	-	C	Aconitase (aconitate hydratase)
						(0.69)				
80	gi 45658618	LIC12787	12550	44	1(1)	-	-	-	C	Sulphate Transporter and Anti-Sigma
81	gi 45657648	LIC11782	39965	44	1(1)	-	-	-	C	hypothetical protein
82	gi 45656999	LIC11115	32290	43	1(1)	-	-	-	C	thiosulfate sulfurtransferase
83	gi 45658704	LIC12874	11460	42	1(1)	-	-	-	C	Ribosomal S10p/S20e ; protein
84	gi 45657293	LIC11417	22156	40	1(1)	-	-	-	C	Caseinolytic (ClpP). protease
85	gi 45659058	LIC13237	20535	37	1(1)	-	-	-	C	lysine decarboxylase

Tabela B1 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1).

(continuação)										
86	gi 45659137	LIC13318	42495	36	2(2)	+	-	-	ND	fatty acid synthase subunit beta
						(0.89)				
87	gi 45655923	LIC10009	27858	34	2(1)	+	-	-	ND	lipoprotein
						(0.93)				
88	gi 45657958	LIC12110	16597	33	2(2)	-	-	-	C	50S ribosomal protein L9
89	gi 45657330	LIC11455	134776	32	2(2)	-	-	-	C	transcription-repair coupling factor
90	gi 45657424	LIC11551	72960	31	1(1)	-	-	-	C	primosomal protein N'
91	gi 45658605	LIC12772	31176	31	2(1)	-	-	-	C	gamma-glutamyl kinase
92	gi 45657140	LIC11257	59102	29	3(1)	-	-	-	C	exopolyphosphatase
93	gi 45655703	LIC20121	97947	26	1(1)	-	-	-	C	histidinol-phosphate aminotransferase
94	gi 45655979	LIC10065	19573	23	3(1)	-	-	-	C	deoxycytidine triphosphate deaminase
95	gi 45657896	LIC12047	282955	23	4(1)	+	-	+	ND	hypothetical protein
						(0.94)			(MS)	(Potential Tat signal peptide but No Tat motif was found)

Tabela B1 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1).

96	gi 45658609	LIC12776	11871	23	1(1)	+	-	-	(conclusão) C	50S ribosomal protein L21
						(0.91)				
97	gi 45657171	LIC11290	43760	22	2(1)	-	-	-	MC	hypothetical protein
98	gi 45658103	LIC12254	59678	19	1(1)	-	-	-	ND	outer membrane protein
99	gi 45657462	LIC11590	10905	18	3(1)	-	-	-	C	Exonuclease VII .
100	gi 45656584	LIC10686	47903	16	2(1)	+	-	-	ND	Putative lipoprotein
						(0.87)			(MS)	

Tabela B2 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 2).
(continua)

No.	Números de acesso	Nomenclatura do gene	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>							ANOTAÇÃO DO GENOMA
			Massa (Da)	Score	Matches	Secretome 2.0	Signal P 4.0	TatP 1.0	PSORTb V 3.0	
1.	gi 45657213	LIC11335	57963	2185	36(32)	-	-	-	C	Co-chaperonin GroEL
2.	gi 45656176	LIC10272	79415	1017	19(19)	-	-	-	C	elongation factor G
3.	gi 45656096	LIC10191	20958	963	11(11)	+ (0.91)	+	-	NC	hypothetical protein
4.	gi 45658676	LIC12846	36722	770	11(11)	-	-	-	C	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
5.	gi 45658253	LIC12407	53421	690	16(16)	-	-	-	C	glutamine synthetase protein
6.	gi 45657831	LIC11978	11536	656	12(12)	-	-	-	C	thioredoxin
7.	gi 45658705	LIC12875	43662	595	8(7)	-	-	-	C	elongation factor Tu
8.	gi 45656423	LIC10525	24217	537	6(6)	+ (0.90)	-	-	C	heat shock protein GrpE

Tabela B2 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 2).

(continuação)

9.	gi 45656648	LIC10754	158164	501	9(7)	-	-	-	C	DNA-directed RNA polymerase subunit Beta
10.	gi 45656646	LIC10752	12800	483	11(9)	-	+	-	NC (MS*)	50S ribosomal protein L7/L12
11.	gi 45658082	LIC12233	38128	468	10(9)	-	-	-	ND	fructose-bisphosphate aldolase
12.	gi 45657230	LIC11352	29652	443	7(6)	+	+	-	NC	LipL32
						(0.92)				
13.	gi 45656504	LIC10606	19712	405	5(3)	-	-	-	C	DNA-binding stress protein
14.	gi 45657387	LIC11514	14301	343	5(4)	-	-	-	C	hypothetical protein
15.	gi 45656311	LIC10411	17233	334	9(8)	-	+	-	NC	hypothetical protein
16.	gi 45658793	LIC12966	39088	332	5(5)	-	+	-	NC	LipL41
17.	gi 45658704	LIC12874	11460	270	5(5)	-	-	-	C	30S ribosomal protein S10
18.	gi 45657102	LIC11219	21619	260	7(7)	-	-	-	C	peroxiredoxin

Tabela B2 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 2).

(continuação)

19.	gi 45656121	LIC10216	59543	236	5(5)	-	-	-	C	phosphoenolpyruvate carboxykinase
20.	gi 45657810	LIC11951	21737	234	4(4)	-	-	-	C	ATP-dependent protease-like, subunit Clp proteolytic
21.	gi 45657190	LIC11310	21077	224	5(5)	-	-	-	C	Bacterioferritin
22.	gi 45658174	LIC12326	14264	209	4(3)	+	-	-	ND	hypothetical protein
						(0.77)				
23.	gi 45659173	LIC13354	27898	189	4(4)	+	-	-	ND	hypothetical protein
						(0.85)				
24.	gi 45658659	LIC12829	48497	187	2(2)	-	-	-	C	citrate synthase
25.	gi 45655776	LIC20196	19644	180	6(3)	-	-	-	ND	hypothetical protein
26.	gi 45657317	LIC11441	17997	180	3(3)	+	-	-	ND	hypothetical protein
						(0.82)				
27.	gi 45657553	LIC11687	35229	176	2(2)	-	-	-	ND	Endonuclease
28.	gi 45656422	LIC10524	69173	168	8(6)	+	-	-	C	molecular chaperone DnaK_
						(0.62)				

Tabela B2 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 2).

(continuação)

29.	gi 161621774	LIC11781	32294	153	4(3)	+	-	-	ND	malate dehydrogenase
						(0.85)				
30.	gi 45655648	LIC20065	8497	152	7(7)	-	-	-	C	acyl carrier protein
31.	gi 45658337	LIC12495	27686	151	4(4)	-	-	-	C	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase
32.	gi 45658297	LIC12454	13317	150	2(2)	-	-	-	C	response regulator
33.	gi 45658886	LIC13060	38119	149	3(3)	+	+	-	NC	LipL36
						(0.95)				
34.	gi 45658643	LIC12812	41148	146	2(2)	-	-	-	P	serine protease precursor MucD
35.	gi 45657078	LIC11194	37212	143	5(4)	-	-	-	C	citrate lyase
36.	gi 45657214	LIC11336	10556	139	3(3)	-	-	-	C	co-chaperonin GroES
37..	gi 45659286	LIC13470	35056	137	3(3)	-	-	-	MC	ferredoxin--NADP reductase
38.	gi 45656218	LIC10314	63757	135	6(4)	+	+	-	NC (MS*)	hypothetical protein
						(0.79)				

Tabela B2 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 2)_(continuação)

39.	gi 45659186	LIC13367	62719	116	7(5)	-	-	-	C	sulfite reductase subunit beta
40.	gi 45655666	LIC20083	48667	115	7(3)	-	-	-	C	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase
41.	gi 45656744	LIC10853	20588	114	2(2)	-	-	-	C	Ribosome recycling factor
42.	gi 45658540	LIC12705	95033	109	5(2)	+	-	-	C	translation initiation factor IF-2
						(0.89)				
43.	gi 45657648	LIC11782	39965	105	2(2)	-	-	-	C	hypothetical protein
44.	gi 45657374	LIC11499	9054	105	2(2)	+	-	-	ND	hypothetical protein
						(0.92)				
45.	gi 45657838	LIC11985	10145	98	3(3)	-	-	-	C	RNA-binding protein
46.	gi 45656006	LIC10095	13173	98	2(2)	+	+	-	NC	hypothetical protein
						(0.83)				
47.	gi 45658458	LIC12621	14514	98	3(3)	-	-	-	C	hypothetical protein
48.	gi 45657597	LIC11731	17842	96	10(6)	-	-	-	C	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase

Tabela B2 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 2) (continuação)

49.	gi 45657930	LIC12082	33228	96	2(2)	-	-	-	C	cysteine synthase
50.	gi 45656890	LIC11003	62106	94	3(3)	+	+	-	ME	LipL71
						(0.93)				
51.	gi 45655824	LIC20249	82338	88	8(2)	+	-	-	C	aconitate hydratase
						(0.69)				
52.	gi 45657174	LIC11294	78454	88	3(1)	-	-	-	MC	hypothetical protein
53.	gi 45657656	LIC11790	44359	85	3(3)	-	-	--	C	aspartate aminotransferase
54.	gi 45658753	LIC12925	48553	81	1(1)	-	-	-	C	citrate synthase pfam00285
55.	gi 45658181	LIC12335	45120	80	6(2)	+	-	-	C	serine hydroxymethyltransferase
						(0.59)				
56.	gi 45656498	LIC10600	15314	79	2(2)	+	-	-	C	fatty acid synthase subunit beta
						(0.87)				
57.	gi 45656562	LIC10664	18843	77	2(2)	-	-	-	ND	hypothetical protein
58.	gi 45658682	LIC12852	20697	74	1(1)	-	-	-	C	adenylate kinase

Tabela B2 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA₂) (continuação)

59.	gi 45658541	LIC12706	50978	74	2(1)	-	-	-	C	transcription factor NusA	elongation
60.	gi 45655647	LIC20064	26221	73	1(1)	-	-	-	C	3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase	
61.	gi 45656891	LIC11004	12432	69	3(3)	-	-	-	C	anti-sigma factor	
62.	gi 161621777	LIC11241	55539	66	3(2)	-	-	-	C	F0F1 ATP synthase subunit alpha	
63.	gi 45656742	LIC10851	22346	66	2(1)	-	-	-	C	elongation factor Ts	
64.	gi 45659135	LIC13316	35025	63	2(2)	-	-	-	C	ABC transporter	
65.	gi 45657938	LIC12090	36915	61	1(1)	+	-	-	C	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	
66.	gi 45657515	LIC11643	42321	60	1(1)	+	-	-	C	LipL45	
67.	gi 45657522	LIC11652	23649	58	1(1)	-	-	-	C	Translaldolase.	
68.	gi 45657237	LIC11359	44124	56	1(1)	-	-	-	C	hypothetical protein	

Tabela B2 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 2) (continuação)

69.	gi 45656999	LIC11115	32290	55	1(1)	-	-	-	C	thiosulfate sulfurtransferase
70.	gi 45656032	LIC10122	49954	52	1(1)	-	-	-	C	hypothetical protein
71.	gi 45658914	LIC13088	24562	52	1(1)	-	-	-	C	response regulator
72.	gi 45659137	LIC13318	42495	51	2(2)	+	-	-	ND	fatty acid synthase subunit beta
						(0.89)				
73.	gi 45657247	LIC11369	12072	50	1(1)	-	-	-	ND	hypothetical protein
74.	gi 45659166	LIC13347	54275	50	2(1)	-	-	-	C	DNA gyrase subunit A
75.	gi 45655627	LIC20044	69884	49	6(5)	-	-	-	C	heat shock protein 90
76.	gi 45656264	LIC10361	27051	48	1(1)	-	-	-	C	Electron transport flavoprotein subunit BETA
77.	gi 45656647	LIC10753	138029	47	2(1)	-	-	-	C	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
78.	gi 45657939	LIC12091	42975	47	1(1)	-	-	-	C	Phosphoglycerate kinase (PGK)

Tabela B2 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 2).

(continuação)

79.	gi 45657958	LIC12110	16597	46	1(1)	-	-	-	C	50S ribosomal protein L9
80.	gi 45657830	LIC11977	82763	44	1(1)	-	-	-	C	cyclic nucleotide binding protein
81.	gi 45657462	LIC11590	10905	44	2(2)	-	-	-	C	exodeoxyribonuclease VII small subunit
82.	gi 45657258	LIC11380	30852	44	1(1)	-	-	-	C	RNA polymerase sigma factor WhiG
83.	gi 45659065	LIC13244	44908	43	1(1)	-	-	-	C	Isocitrate dehydrogenase
84.	gi 45657293	LIC11417	22156	43	1(1)	-	-	-	C	ATP-dependent Clp protease proteolytic
85.	gi 45657390	LIC11517	61031	41	2(2)	-	-	-	C	acetyl-CoA carboxylase subunit alpha
86.	gi 45658626	LIC12795	47482	35	1(1)	-	-	-	C	acetyl-CoA acetyltransferase
87.	gi 45658605	LIC12772	31176	31	4(1)	-	-	-	C	gamma-glutamyl kinase
88.	gi 45657424	LIC11551	72960	30	1(1)	-	-	-	C	Primosomal protein N'

Tabela B2 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com BSA, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 2)_(conclusão)

89.	gi 45657330	LIC11455	134776	30	3(3)	-	-	-	C	Transcription-repair coupling factor
90.	gi 45658048	LIC12199	37149	28	2(1)	-	-	-	C	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases
91.	gi 45658671	LIC12841	45081	28	1(1)	+	-	-	C	LL-diaminopimelate aminotransferase
						(0.64)				
92.	gi 45655979	LIC10065	19573	27	4(1)	-	-	-	C	Deoxycytidine triphosphate deaminase
93.	gi 45657332	LIC11457	31243	24	2(1)	-	-	-	CM	bacitracin resistance protein
94.	gi 45656980	LIC11096	12212	23	2(1)	-	-	-	ND	hypothetical protein
95.	gi 45656339	LIC10440	12754	22	2(1)	-	-	-	CM	nitrogen regulatory protein PII
96.	gi 45657932	LIC12084	40294	19	3(1)	-	-	-	C	hypothetical protein
97.	gi 45656584	LIC10686	47903	19	2(2)	+	-	-	ND	lipoprotein
						(0.87)			(MS*)	
98.	gi 45655964	LIC10050	77961	18	4(0)	+	+	-	ME	hypothetical protein
						(0.72)				
99.	gi 45658609	LIC12776	11871	17	2(0)	+	-	-	C	50S ribosomal protein L21
						(0.94)				

Tabela B3 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennew--icki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO1).

(continuação)

ID	Número do acesso	Nomenclatura do gene	Massa (Da)	Score	Matches	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>				ANOTAÇÃO GENOMA	DO
						Secretome 2.0	Signal P 4.0	TatP 1.0	PSORTb V 3.0		
1 ²	gi 45657230	LIC11352	29652	378	5(5)	+	+	-	NC	Lip132.	
						(.92)			(OMP)*		
2	gi 45657338	LIC11463	41580	367	6(6)	-	-	-	EX	Esterase/ Lipase	
									(9.52)		
3 ²	gi 45659174	LIC13355	29690	305	5(5)	+	+	-	NC	hypothetical protein	
						(0.92)					
4	gi 45658705	LIC12875	43662	296	6(6)	-	-	-	C	Elongation factor Tu (EF-Tu)	
5 ²	gi 45656096	LIC10191	20958	286	6(6)	+	+	-	NC	Loa22 OmpA-like protein	
						(0.91)					
6 ²	gi 45659173	LIC13354	27898	186	6(5)	+	-	-	ND	hypothetical protein	
						(0.85)					
7 ²	gi 45656646	LIC10752	12800	136	3(3)	-	+	-	NC	50S ribosomal protein L7/L12	
8 ²	gi 45599239	LIC10095	13173	118	1(1)	-	+	-	NC	hypothetical protein	
9 ²	gi 45658886	LIC13060	38119	114	2(2)	+	+	-	NC	hypothetical protein	
		LipL36				(0.95)					

Tabela B3 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennew--icki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO1).
(continuação)

10	gi 45656973	LIC11089	33366	111	3(3)	+	-	-	ND	hypothetical protein
						(0.85)				
11²	gi 45655648	LIC20065	8371	70	2(2)	-	-	-	C	acyl carrier protein
12²	gi 45657214	LIC11336	10556	68	2(2)	-	-	-	C	Co-chaperonin GroEs
13²	gi 45658174	LIC12326	14264	63	2(2)	+	-	-	ND	Hypothetical protein -
						(0.77)				
14	gi 45658297	LIC12454	13317	59	2(2)	-	-	-	C	Signal receiver domain
15	gi 45656504	LIC10606	19712	58	1(1)	-	-	-	C	DNA-binding stress protein
16²	gi 45657374	LIC11499	9054	56	1(1)	+	-	-	ND	hypothetical protein
						(0.92)				
17²	gi 45658643	LIC12812	41148	56	2(2)	-	-	-	P	serine protease MucD precursor
18	gi 45658468	LIC12631	71209	55	4(1)	+	-	-	EX	hemolysin
						(0.94)				
19²	gi 45656176	LIC10272	79415	53	3(3)	-	-	-	C	Elongation factor Tu (EF-Tu)

Tabela B3 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennew--icki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO1).
(continuação)

20²	gi 45656896	LIC11009	28522	43	2(1)	-	+	-	NC	hypothetical protein
21²	gi 45657930	LIC12082	33228	38	1(1)	-	-	-	C	cysteine synthase
22	gi 45658102	LIC12253	25831	38	1(1)	+	-	-	ND	lipoprotein
						(0.74)				
23	gi 45655777	LIC20197	87843	30	2(2)	+	-	-	ME	cysteine protease
						(0.94)				
24	gi 45657533	LIC11663	44505	29	1(1)	-	-	-	C	deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase
25	gi 45656042	LIC10132	78283	29	2(1)	-	-	-	C	sigma 54 activator
26	gi 45657213	LIC11335	57963	29	1(1)	-	-	-	C	chaperonin GroEL
27	gi 45658571	LIC12737	63067	29	3(3)	-	-	-	C	site-specific modification DNA-methyltransferase
28²	gi 45659283	LIC13467	51873	28	2(2)	+	-	-	ND	hypothetical protein
						(0.94)				
29	gi 45656183	LIC10279		24	1(1)	-	-	-	C	hypothetical protein

Tabela B3 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennew--icki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO1). (conclusão)

30	gi 45658682	LIC12852	20697	21	1(1)	-	-	-	C	adenylate kinase
31	gi 45657562	LIC11696	22299	21	1(1)	-	-	-	ND	hypothetical protein
32²	gi 45657174	LIC11294	78454	19	4(1)	-	-	-	C MC	Fe-S oxidoreductase
33²	gi 45657945	LIC12097	43239	18	3(1)	-	-	-	MC	histidine kinase sensor protein
34	gi 45656816	LIC10927	54976	16	3(1)	+	-	-	EX	Pectinacetylerase
						(0.93)				
35²	gi 45656584	LIC10686	47903	15	3(1)	+	-	-	ND	lipoproteína
						(0.87)			(MS*)	

Tabela B4 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com SORO, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO2).
(continua)

ID	Número do acesso	Nomenclatura do gene	Massa (Da)	Score	Matches	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>				ANOTAÇÃO DO GENOMA
						Secretome 2.0	Signal P 4.0	TatP 1.0	PSORTb V 3.0	
1	gi 45658886	LIC13060	38119	189	3(3)	+ (0.95)	+	-	NC (MS*)	LipL36
2	GI:45659174	LIC13355	29690	415	7(7)	+ (0.92)	+	-	NC	Hypothetical protein
3	GI:45656096	LIC10191	20958	311	6(6)	+ (0.91)	+	-	NC	Loa22- protein OmpA
4	GI:45657338	LIC11463	41580	266	5(5)	-	-	-	EX	Esterases and lipases
5	GI:45658643	LIC12812	41148	234	4(4)	-	-	-	P	serine protease MucD precursor Trypsin-like serine protease;
6	GI:45659173	LIC13354	27898	209	4(4)	+ (0.85)	-	-	ND	hypothetical protein
7	GI:45656646	LIC10752	12800	166	4(4)	-	+	-	NC	50S ribosomal protein L7/L12
8	GI:45657214	LIC11336	10556	126	4(4)	-	-	-	C	Co-chaperonin GroEs

Tabela B4 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com SORO, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO2).
(continuação)

9	GI:45657930	LIC12082	33228	120	2(2)	-	-	-	C	cysteine synthase
10	GI:45658174	LIC12326	14264	105	2(2)	+	-	-	NC	hypothetical protein
11	GI:45657831	LIC11978	11536	79	5(5)	-	-	-	C	thioredoxin
12	GI:45658753	LIC12925	48553	73	4(4)	-	-	-	C	Citrate synthase
13	GI:45656896	LIC11009	28522	72	3(1)	-	+	-	NC	hypothetical protein
14	GI:45656218	LIC10314	63757	65	6(6)	+	+	-	NC (*MS)	hypothetical protein
15	gi 45655648	LIC20065	8497	47	4(2)	-	-	-	C	Phosphopantetheine attachment site.
16	GI:45657374	LIC11499	9054	43	1(1)	+	-	-	ND	hypothetical protein
17	GI:45656176	LIC10272	79415	43	2(2)	-	-	-	C	Elongation factor Tu (EF-Tu)

Tabela B4 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com SORO, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO2).

(continuação)

18	GI:45656006	LIC10095	13173	11834	2(2)	+	+	-	NC	hypothetical protein
						(0.83)				
19	gi 45657502	LIC11630	76216	32	2(2)	-	-	-	C	long-chain-fatty-acid CoA ligase
20	GI:45658102	.LIC12253	25831	38	1(1)	+	+	-	NC	hypothetical protein
						(0.74)				
21	GI:45655777	LIC20197	87650	30	2(2)	+	-	-	ME	cysteine protease
						(0.94)				
22	GI:45656311	LIC10411	17233	29	1(1)	-	+	-	NC	hypothetical protein
23	gi 45656042	.LIC10132	78283	29	2(1)	-	-	-	C	sigma 54 activator
24	gi 45657543	LIC11675	63007	27	1(1)	-	-	-	C	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
25	gi 45656816	LIC10927	54976	27	1(1)	+	-	-	EX	Pectinacetylerase
						(0.93)				
26	gi 45657533	LIC11663	44505	25	1(1)	-	-	-	C	deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase

Tabela B4 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, crescida em meio EMJH enriquecido com SORO, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO2).

										(conclusão)
27	gi 45655964	LIC10050	77961	24	1(1)	+	+	-	ME	peptidoglycan-associated cytoplasmic membrane protein
						(0.72)				
28	gi 45658813	LIC12986	72222	20	2(1)	+	+	-	EX	hypothetical protein
						(0.89)				
29	gi 45657209	LIC11329	85243	18	4(1)	-	-	-	MC	ribonuclease BN transmembrane protein
30	gi 45657174	LIC11294	78454	19	4(1)	-	-	-	MC	Fe-S oxidoreductase
31	gi 45656698	LIC10807	18473	16	1(1)	-	-	-	C	glutathione S-transferase
32	gi 45658266	LIC12421	115117	14	2(0)	-	-	-	C	hypothetical protein

Tabela B5 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 1). (continua)

ID	Número de acesso	Nomenclatura do gene	Massa (Da)	Score	Matches	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>				ANOTAÇÃO DO GENOMA
						Secretome 2.0	Signal P 4.0	TatP 1.0	PSORTb V 3.0	
1 ⁴	gi 183222206	LEPBI_12857	20956	321	18(5)	+	+	-	NC	hypothetical protein
						(0.95)			(MS*)	
2 ⁴	gi 183221349	LEPBI_I1966	44012	291	12(8)	-	-	-	C	elongation factor EF-Tu
3 ⁴	gi 183221002	LEPBI_13038	67373	262	16(0)	-	-	-	C	GMP synthase
4 ⁴	gi 183222384	LEPBI_I3038	22742	233	5(3)	+	+	-	EX	hypothetical protein
						(0.95)				
5 ⁴	gi 183222336	LEPBI_I2989	59596	160	10(1)	+	-	-	C	phosphoenolpyruvate carboxykinase
						(0.73)				
6 ⁴	gi 183222240	LEPBI_I2891	45079	147	5(0)	-	-	-	ND	Isocitrate dehidrogenase
									(MS*)	
7 ⁴	gi 189913316	LEPBI_II0146	24608	124	6(1)	+	-	-	C	Peroxiredoxin
						(0.91)				
8 ⁴	gi 183220549	LEPBI_I1153	79157	113	11(0)	-	-	-	C	Fator de elongação G
9 ⁴	gi 183220863	LEPBI_I1476	36633	96	3(1)	-	+	-	P	ABC transport system, periplasmic component
10 ⁴	gi 183221714	LEPBI_I2343	10301	89	4(2)	-	-	-	C	Chaperonina GROES
11 ⁴	gi 183222028	LEPBI_I2670	39056	88	3(1)	+	+	-	NC	putative signal peptide
						(0.91)			(MS*)	

Tabela B5 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 1). (continuação)

12	gi 183221462	LEPBI_I2080	36348	86	3(1)	+	-	-	C	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, C-terminal domain
						(0.78)				
13⁴	gi 183222771	LEPBI_I3430	25355	78	4(1)	+	-	-	EX	hypothetical protein
						(0.94)				
14	gi 183220541	LEPBI_I1144	34800	74	6(0)	-	-	-	ND	malate dehydrogenase
15	gi 189913316	LEPBI_II0146	24029	74	5(0)	-	-	-	C	Peroxisredoxin
16⁴	gi 183221973	LEPBI_I2614	20741	61	1(1)	-	-	-	C	ribosome recycling factor
17⁴	gi 183221946	LEPBI_I2585	8492	60	3(1)	-	-	-	C	acyl carrier protein
18	gi 183221928	LEPBI_I2567	43363	56	3(0)	-	-	-	C	putative Cys/Met metabolism PLP-dependent enzyme
19	gi 183222811	LEPBI_I3472	66674	53	3(2)	-	+	-	CM	ABC transporter, permease/ATP-binding protein;
20	gi 183222590	LEPBI_I3245	19768	51	4(0)	+	+	-	NC	hypothetical protein
						(0.61)				

Tabela B5 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 1). (conclusão)

21	gi 183222216	LEPBI_I2867	130108	51	1(1)	+	+	-	EX	hypothetical protein
						(0.94)				

Tabela B6 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 2). (continua)

No.	Números de acesso	Nomenclatura do gene	Massa (Da)	Score	Matches	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>				ANOTAÇÃO NO GENOMA
						Secretome 2.0	Signal P 4.0	TatP 1.0	PSORTb V 3.0	
1	gi 183221349	LEPBI_I1966	44012	319	14(6)	-	-	-	C	elongation factor EF-Tu
2	gi 183222206	LEPBI_I2857	20956	305	6(3)	+	+	-	ND	hypothetical protein
						(0.95)			(MS*)	
3	gi 183221002	LEPBI_I13038	67373	253	12(3)	-	-	-	C	GMP synthase
4	gi 183222384	LEPBI_I3038	22742	191	8(3)	+	+	-	EX	hypothetical protein
						(0.95)				
5	gi 183222336	LEPBI_I2989	59596	145	7(3)	+	-	-	C	phosphoenolpyruvate carboxykinase
						(0.73)				
6	gi 189913316	LEPBI_II0146	24608	116	6(1)	+	-	-	C	Peroxioredoxin
						(0.91)				
7	gi 183222240	LEPBI_I2891	45079	100	5(0)	-	-	-	ND	Isocitrate desidrogenase
									(MS*)	
8	gi 183219454	LEPBI_I0027	21272	96	3(2)	+	-	-	P	superoxide dismutase
						(0.92)				
9	gi 183222771	LEPBI_I3430	25355	89	3(0)	+	-	-	EX	hypothetical protein
						(0.94)				

Tabela B6 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 2). (continuação)

10	gi 183220549	LEPBI_I1153	79157	86	8(0)	-	-	-	C	Fator de alongação G
11	gi 183222028	LEPBI_I2670	39163	84	3(1)	+	+	-	NC	hypothetical protein
						(0.91)			(MS*)	
12	gi 183221714	LEPBI_I2343	10301	81	5(2)	-	-	-	C	Chaperonina GROES
13	gi 183220863	LEPBI_I1476	36353	78	5(0)	-	+	-	P	ABC transporter substrate-binding protein
14	gi 183222463	LEPBI_I3117	45801	66	5(0)	+	-	-	C	alcohol dehydrogenase
						(0.84)				
15	gi 183221710	LEPBI_I2338	18436	63	3(1)	-	-	-	C	putative cAMP-binding protein
16	gi 183222142	LEPBI_I2785	10540	58	3(0)	+	-	-	ND	hypothetical protein
						(0.58)				
17	gi 183221946	LEPBI_I2585	8492	58	3(2)	-	-	-	C	acyl carrier protein
18	gi 183221499	LEPBI_I2117	44706	57	2(1)	+	+	-	NC	hypothetical protein
						(0.74)			(MS*)	

Tabela B6 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 2). (conclusão)

19	gi 183222229	LEPBI_I2880	42933	55	2(1)	-	-	-	C	acyl-CoA dehydrogenase
20	gi 183221355	LEPBI_I1973	12800	54	1(1)	+	-	-	C	50S ribosomal protein L7/L12
21	gi 183221973	LEPBI_I2614	20741	53	3(0)	-	-	-	C	ribosome recycling factor
22	gi 183222811	LEPBI_I3472	66674	53	5(2)	-	-	-	MC	ABC transporter, permease/ATP-binding protein

Tabela B7- Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 3).

(continua)

No.	Números de acesso	Nomenclatura do gene	Massa (Da)	Score	Matches	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>				ANOTAÇÃO GENOMA	NO
						Secretome 2.0	Signal P 4.0	TatP 1.0	PSORTb V 3.0		
1	gi 183221349	LEPBI_I1966	44012	643	34(12)	-	-	-	C	elongation factor EF-Tu	
2	gi 183221002	LEPB1_13038	67373	568	39(10)	-	-	-	C	GMP synthase	
3	gi 183220549	LEPBI_I1153	79157	484	30(8)	-	-	-	C	Fator de elongação G	
4	gi 183222336	LEPBI_I2989	59596	393	15(5)	+ (0.73)-	-	-	C	phosphoenolpyruvate carboxykinase	
5	gi 183222206	LEPB1_12857	20956	339	15(6)	+ (0.95)	+	-	NC (MS*)	hypothetical protein	
6	gi 183222240	LEPBI_I2891	45079	289	14(2)	-	-	-	ND (MS*)	Isocitrate dehydrogenase	
7.	gi 183221438	LEPBI_I2056	43810	283	10(3)	-	-	-	C	succinyl-CoA synthetase subunit beta	
8	gi 183220541	LEPBI_I1144	34800	282	13(4)	+ (0.82)	-	-	ND	malate dehydrogenase	
9	gi 189913316	LEPBI_II0146	24435	124	6(1)	+ (0.91)	-	-	C	peroxidase	

Tabela B7- Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 3). (continuação)

10	gi 183220120	LEPBI_I0708	36025	195	9(2)	-	-	-	C	ketol-acid reductoisomerase
11	gi 183222463	LEPBI_I3117	45801	184	7(3)	+	-	-	C	alcohol dehydrogenase
						(0.84)				
12	gi 183219454	LEPBI_I0027	21272	177	6(2)	+	-	-	P	superoxide dismutase
						(0.92)				
13	gi 183221714	LEPBI_I2343	10301	163	7(4)	-	-	-	C	Chaperonina GROES
14	gi 183220980	LEPBI_I1593	47265	160	13(1)	-	-	-	C	Aspartate aminotransferase
15	gi 183222590	LEPBI_I3245	19768	158	5(2)	+	+	-	NC	hypothetical protein
						(0.61)				
16	gi 183222316	LEPBI_I2968	42384	150	5(2)	-	-	-	C	S-adenosylmethionine synthetase.
17	gi 183219665	LEPBI_I0240	43241	140	8(0)	-	-	-	ND	CoA-acyl carrier protein transacylase
18	gi 183220119	LEPBI_I0707	47449	133	4(2)	-	-	-	C	Putative acetyl-CoA acetyltransferase.

Tabela B7- Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 3). (continuação)

19	gi 183221355	LEPBI_I1973	12641	133	10(4)	+	+	-	NC (Ms*)	50S ribosomal protein L7/L12.
20	gi 183220361	LEPBI_I0957	11998	124	5(0)	+	-	-	ND	hypothetical protein
						(0.70)				
21	gi 183220863	LEPBI_I1476	36633	124	5(0)	-	+	-	P	ABC transport system, periplasmic component
22	gi 183219477	LEPBI_I0050	27224	124	5(0)	+	-	-	C	3-oxoacyl-ACP reductase_
						(0.74)				
23	gi 183222384	LEPBI_I3038	22742	122	2(2)	+	+	-	EX	hypothetical protein
						(0.95)				
24	gi 189913417	LEPBI_II0249	81536	122	5(0)	+	-	-	C	aconitate hydratase
						(0.86)				
25	gi 183221499	LEPBI_I2117	44706	119	6(1)	+	+	-	NC (MS*)	hypothetical protein
						(0.74)				
26	gi 189913353	LEPBI_II0185	48758	116	5(0)	-	-	-	C	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase
27	gi 183220531	LEPBI_I1133	27187	112	3(1)	-	-	-	C	electron transfer flavoprotein subunit beta
28	gi 183221462	LEPBI_I2080	36348	109	4(1)	+	-	-	C	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
						(0.78)				

Tabela B7- Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 3).

(continuação)

29	gi 183222724	LEPBI_I3380	21518	105	4(1)	+	-	-	C	heat shock protein GrpE_ chaperone GrpE
30	gi 183220016	LEPBI_I0599	47708	95	8(0)	-	-	-	C	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
31	gi 183221001	LEPBI_I1614	15448	87	5(0)	-	-	-	ND	7-cyano-7-deazaguanine reductase_
32	gi 183221033	LEPBI_I1646	31536	86	4(0)	-	-	-	C	2-dehydro-3- deoxyphosphooctonate aldolase_
33	gi 183222511	LEPBI_I3166	14999	85	4(2)	+	-	-	ND	putative MaoC-like dehydratase
34	gi 183221327	LEPBI_I1944	20538	81	2(1)	-	-	-	C	adenylate kinase_
35	gi 183219973	LEPBI_I0555	11589	81	2(0)	+	-	-	ND	hypothetical protein
36	gi 183220748	LEPBI_I1358	21859	78	5(0)	-	-	-	C	alkyl hydroperoxide reductase subunit C_
37	gi 183222028	LEPBI_I2670	39163	71	3(0)	+	+	-	NC (MS*)	hypothetical protein
38	gi 183222662	LEPBI_I3317	61792	68	3(1)	-	-	-	C	acyl-CoA dehydrogenase_ Lipid metabolism

Tabela B7- Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 3).
(continuação)

39	gi 183222721	LEPBI_I3377	35681	67	2(1)	-	-	-	C	oxidoreductase
40	gi 183221904	LEPBI_I2543	44213	66	4(0)	-	-	-	C	aspartate aminotransferase A
41	gi 183221973	LEPBI_I2614	20741	66	4(0)	-	-	-	C	Ribosome recycling factor
42	gi 183221439	LEPBI_I2057	30789	64	3(0)	+	-	-	C	Succinyl-CoA synthetase subunit alpha
43	gi 183220976	LEPBI_I1589	31046	64	2(2)	-	-	-	P	flagellar filament core protein FlaB
44	gi 183219429	LEPBI_I0002	41347	64	4(0)	-	-	-	C	DNA polymerase III subunit beta
45	gi 183222072	LEPBI_I2714	27764	60	2(0)	+	-	-	ND	hydroxyethylthiazole kinase
46	gi 183221291	LEPBI_I1908	25601	60	5(0)	-	-	-	C	putative glutathione S- transferase
47	gi 183221691	LEPBI_I2316	44851	59	3(1)	-	-	-	C	acetylornithine aminotransferase_
48	gi 189913400	LEPBI_II0232	20939	58	5(0)	+	-	-	C	hypothetical protein

Tabela B7- Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 3).
(conclusão)

49	gi 183221946	LEPBI_I2585	8492	58	5(0)	-	-	-	C	acyl carrier protein
50	gi 183220999	LEPBI_I1612	8620	52	2(2)	-	-	-	ND	putative ferredoxin
51	gi 183221975	LEPBI_I2616	21988	51	2(1)	-	-	-	C	elongation factor Ts

Tabela B8 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 4).

(continua)

ID	Número de acesso	Nomenclatura do gene	Massa (Da)	Score	Matches	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>				ANOTAÇÃO GENOMA	DO
						Secretome 2.0	Signal P 4.0	TatP 1.0	Psortdb V 3.0		
1	gi 183221349	LEPBI_I1966	44012	657	32(14)	-	-	-	C	elongation factor EF-Tu	
2	gi 183221002	LEPB1_13038	67373	503	30(8)	-	-	-	C	GMP synthase	
3	gi 183220549	LEPBI_I1153	79157	410	25(4)	-	-	-	C	Fator de elongação G	
4	gi 189913316	LEPBI_II0146	24435	377	13(6)	+ (0.91)	-	-	C	peroxidase	
5	gi 183222206	LEPB1_12857	20956	330	15(7)	+ (0.95)	+	-	NC (MS*)	hypothetical protein	
6	gi 183222336	LEPBI_I2989	59596	288	15(4)	+ (0.73)	-	-	C	phosphoenolpyruvate carboxykinase	
7.	gi 183221438	LEPBI_I2056	43810	284	13(3)	-	-	-	C	succinyl-CoA synthetase subunit beta	
9	gi 183222240	LEPBI_I2891	45079	204	10(0)	-	-	-	ND (MS*)	Isocitrate dehydrogenase	
10	gi 183220531	LEPBI_I1133	27187	194	5(2)	-	-	-	C	electron flavoprotein beta	transfer subunit

Tabela B8 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 4).
(continuação)

11	gi 183221714	LEPBI_I2343	10301	169	9(3)	-	-	-	C	Chaperonina GROES
12	gi 183219454	LEPBI_I0027	21272	165	3(2)	-	-	-	P	superoxide dismutase
13	gi 183222463	LEPBI_I3117	45801	165	6(3)	+	-	-	C	alcohol dehydrogenase
						(0.84)				
14	gi 183220541	LEPBI_I1144	34800	161	10(1)	-	-	-	ND	malate dehydrogenase
15	gi 183220120	LEPBI_I0708	36361	150	10(1)	-	-	-	C	ketol-acid reductoisomerase
16	gi 183220980	LEPBI_I1593	47265	149	8(0)	-	-	-	C	Aspartate aminotransferase
17	gi 183220119	LEPBI_I0707	47449	147	7(2)	-	-	-	C	putative acetyl-CoA acetyltransferase
18	gi 183221499	LEPBI_I2117	44706	143	5(2)	+	+	-	NC (MS*)	hypothetical protein
						(0.74)				
19	gi 183221355	LEPBI_I1973	12641	141	7(2)	+	+	-	NC (Ms*)	50S ribosomal protein L7/L12
20	gi 183222028	LEPBI_I2670	39163	137	10(0)	+	+	-	NC	hypothetical protein
						(0.91)				

Tabela B8 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 4).
(continuação)

21	gi 183222590	LEPBI_I3245	19768	132	6(1)	+	+	-	NC	hypothetical protein
						(0.61)				
22	gi 183222384	LEPBI_I3038	22742	114	4(4)	+	+	-	EX	hypothetical protein
						(0.95)				
23	gi 183220748	LEPBI_I1358	21859	105	5(1)	-	-	-	C	alkyl hydroperoxide reductase subunit C_
24	gi 183219665	LEPBI_I0240	43241	94	6(0)	-	-	-	ND	CoA-acyl carrier protein transacylase
25	gi 189913353	LEPBI_II0185	48758	89	3(1)	-	-	-	C	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase
26	gi 183221001	LEPBI_I1614	15448	85	5(0)	-	-	-	ND	7-cyano-7-deazaguanine reductase_
27	gi 183222072	LEPBI_I2714	27764	84	3(1)	-	-	-	ND	hydroxyethylthiazole kinase
28	gi 183222724	LEPBI_I3380	21518	84	4(2)	+	-	-	C	heat shock protein GrpE chaperone
						(0.77)				
29	gi 183221439	LEPBI_I2057	30789	78	3(0)	-	-	-	C	Succinyl-CoA synthetase subunit alpha

Tabela B8 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 4).

(continuação)

30	gi 183221710	LEPBI_I2338	18555	77	5(0)	-	-	-	C	putative cAMP-binding protein
31	gi 183222511	LEPBI_I3166	14999	76	4(3)	+(0.84)	-	-	ND	putative MaoC-like dehydratase
32	gi 183220976	LEPBI_I1589	31046	71	1(1)	-	-	-	P	flagellar filament core protein FlaB
33	gi 183222316	LEPBI_I2968	42384	70	2(0)	-	-	-	C	S-adenosylmethionine synthetase,
34	gi 183221462	LEPBI_I2080	36348	70	4(0)	-	-	-	C	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
35	gi 183222229	LEPBI_I2880	42933	66	1(1)	-	-	-	C	acyl-CoA dehydrogenase_ Lipid metabolism
36	gi 189913400	LEPBI_II0232	20939	65	6(0)	-	-	-	C	hypothetical protein
37	gi 183221975	LEPBI_I2616	21988	65	2(1)	-	-	-	C	elongation factor Ts
38	gi 183220948	LEPBI_I1561	8773	65	3(0)	-	-	-	ND	hypothetical protein
39	gi 183221317	LEPBI_I1934	47118	61	3(2)	-	-	-	C	adenylosuccinate synthetase

Tabela B8 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA SORO 4).
(conclusão)

40	gi 183220999	LEPBI_I1612	8620	60	2(2)	-	-	-	ND	putative ferredoxin
41	gi 183219511	LEPBI_I0084	15385	59	2(0)	-	-	-	EX	nucleoside diphosphate kinase
42	gi 183220196	LEPBI_I0786	44113	59	3(2)	-	-	-	ND	putative acyl dehydratase
43	gi 183219941	LEPBI_I0523	41321	57	5(0)	-	-	-	P	putative serine-type endopeptidase.
44	gi 183220806	LEPBI_I1417	11312	57	2(2)	-	+	-	NC	hypothetical protein
45	gi 183221946	LEPBI_I2585	8492	55	3(2)	-	-	-	C	acyl carrier protein
46	gi 183221905	LEPBI_I2544	64376	53	3(0)	-	-	-	C	putative DNA repair helicase
47	gi 189912884	LEPBI_II0036	11027	53	1(1)	-	-	-	C	DNA-binding protein
48	gi 189913328	LEPBI_II0158	13986	52	2(1)	-	-	-	ND	photoactive yellow protein (PYP)
49	gi 183220863	LEPBI_I1476	36633	50	2(1)	-	+	-	P	ABC transport system, periplasmic component

Tabela B9 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1).

(continua)

No.	Números de acesso	Nomenclatura do gene	Massa (Da)	Score	Matches	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>				ANOTAÇÃO NO GENOMA
						Secretome 2.0	Signal P 4.0	TatP 1.0	PSORTb V 3.0	
1	gi 183221349	LEPBI_I1966	44012	968	37(27)	-	-	-	C	elongation factor EF-Tu
2	gi 183220549	LEPBI_I1153	79157	495	25(21)	-	-	-	C	Fator de elongação G
3	gi 183220541	LEPBI_I1144	34800	469	18(16)	-	-	-	ND	malate dehydrogenase
4	gi 183222336	LEPBI_I2989	59596	434	31(18)	+ (0.73)	-	-	C	phosphoenolpyruvate carboxykinase
5	gi 183222240	LEPBI_I2891	45079	405	26(21)	-	-	-	ND (MS*)	Isocitrate dehidrogenase
6	gi 183220531	LEPBI_I1133	27187	342	11(9)	-	-	-	C	electron transfer flavoprotein subunit beta
7	gi 183219665	LEPBI_I0240	43023	293	15(9)	- (0.45)	-	-	ND	Fatty acid synthase subunit beta
8	gi 183222463	LEPBI_I3117	45801	165	8(6)	+ (0.84)	-	-	C	alcohol dehydrogenase
9	gi 183221701	LEPBI_I2328	12344	179	12(8)	- (0.04)	-	-	ND	putative anti-sigma factor antagonist
10	gi 183222511	LEPBI_I3166	14820	165	4(4)	+ (0.84)	-	-	ND	putative MaoC-like dehydratase

Tabela B9 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1). (continuação)

11	gi 189913417	LEPBI_II0249	81536	153	8(4)	+	-	-	C	aconitate hydratase
						(0.86)				
12	gi 183221317	LEPBI_I1934	47118	132	4(4)	-	-	-	C	adenylosuccinate synthetase_
13	gi 183221438	LEPBI_I2056	43810	127	8(4)	-	-	-	C	succinyl-CoA synthetase subunit beta
14	gi 183219454	LEPBI_I0027	21272	123	5(2)	-	-	-	P	superoxide dismutase
15	gi 183222072	LEPBI_I2714	27764	120	10(8)	-	-	-	ND	hydroxyethylthiazole kinase
16	gi 183221463	LEPBI_I2081	42608	117	11(7)	-	-	-	C	phosphoglycerate kinase
						(0.05)				
17	gi 183221462	LEPBI_I2080	36348	111	5(2)	-	-	-	C	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
18	gi 183221172	LEPBI_I1786	27716	96	3(3)	-	-	-	C	enoyl-CoA hydratase
						(0.05)				
19	gi 183220698	LEPBI_I1308	20356	91	3(3)	-	-	-	C	putative acireductone dioxygenase
						(0.06)				

Tabela B9 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1). (continuação)

20	gi 183222229	LEPBI_I2880	42933	88	4(4)	-	-	-	C	acyl-CoA dehydrogenase_ Lipid metabolism
21	gi 183219778	LEPBI_I0355	40635	84	8(5)	-	-	-	C	acetyl-CoA acetyltransferase
						(0.32)				
22	gi 183221714	LEPBI_I2343	10301	169	9(3)	-	-	-	C	Chaperonina GROES
23	gi 183219511	LEPBI_I0084	15385	72	8(5)	-	-	-	EX	nucleoside diphosphate kinase
24	gi 189913405	LEPBI_II0237	27626	72	4(2)	-	-	-	C	two-component response regulator
						(0.06)				
25	gi 183221127	LEPBI_I1741	11616	71	2(2)	-	-	-	ND	putative anti-sigma factor antagonist
						(0.05)				
26	gi 189913217	LEPBI_II0044	74877	69	10(4)	-	-	-	C	methylmalonyl-CoA mutase
						(0.06)				
27	gi 183222641	LEPBI_I3296	33607	66	2(2)	-	-	-	C	putative 2-nitropropane dioxygenase
						(0.09)				
28	gi 183221355	LEPBI_I1973	12641	60	7(3)	+	+	-	NC (Ms*)	50S ribosomal protein L7/L12
29	gi 183220119	LEPBI_I0707	47177	60	4(1)	-	-	-	C	putative acetyl-CoA acetyltransferase
						(0.06)				

Tabela B9 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1). (continuação)

30	gi 183221730	LEPBI_I2359	33568	60	1(1)	- (0.10)	-	-	C	thioredoxin reductase 1
31	gi 183220593	LEPBI_I1197	12279	60	7(4)	- (0.10)	-	-	ND	putative anti-sigma factor antagonist
32	gi 183221691	LEPBI_I2316	44520	56	3(1)	- (0.15)	-	-	C	acetylornithine aminotransferase
33	gi 183221033	LEPBI_I1646	31536	51	1(1)	-	-	-	C	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase_
34	gi 183219761	LEPBI_I0338	27448	49	4(1)	- (0.12)	-	-	C	enoyl-CoA hydratase
35	gi 183221976	LEPBI_I2617	33354	47	1(1)	- (0.12)	-	-	C	30S ribosomal protein S2
36	gi 183221291	LEPBI_I1908	25430	41	1(1)	- (0.25)	-	-	C	putative glutathione S-transferase
37	gi 183222472	LEPBI_I3126	18001	41	4(1)	- (0.34)	-	-	C	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD
38	gi 183222253	LEPBI_I2904	18240	40	5(2)	+ (0.89)	-	-	ND (MS)	thiol peroxidase
39	gi 183219429	LEPBI_I0002	41347	39	11)	-	-	-	C	DNA polymerase III subunit beta

Tabela B9 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1). (conclusão)

40	gi 183220120	LEPBI_I0708	36025	38	2(1)	-	-	-	C	ketol-acid reductoisomerase	
41	gi 183222723	LEPBI_I3379	68915	34	3(1)	-	-	-	C	molecular DnaK	chaperone
42	gi 183220530	LEPBI_I1132	32587	32	5(1)	+	-	-	ND	electron flavoprotein alpha	transfer subunit

Tabela B10 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1).

(continua)

No	Números de acesso	Nomenclatura do gene	Massa (Da)	Score	Matches	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>				ANOTAÇÃO NO GENOMA
						Secretome 2.0	Signal P 4.0	TatP 1.0	PSORTb V 3.0	
1	gi 183221349	LEPBI_I1966	44012	968	37(27)	-	-	-	C	elongation factor EF-Tu
2	gi 183220549	LEPBI_I1153	79157	495	25(21)	-	-	-	C	Fator de elongação G
3	gi 183220541	LEPBI_I1144	34800	469	18(16)	-	-	-	ND	malate dehydrogenase
4	gi 183222336	LEPBI_I2989	59596	434	31(18)	+ (0.73)	-	-	C	phosphoenolpyruvate carboxykinase
5	gi 183222240	LEPBI_I2891	45079	405	26(21)	-	-	-	ND (MS*)	Isocitrate dehydrogenase
6	gi 183220531	LEPBI_I1133	27187	342	11(9)	-	-	-	C	electron transfer flavoprotein subunit beta
7	gi 183219665	LEPBI_I0240	43023	293	15(9)	- (0.45)	-	-	ND	Fatty acid synthase subunit beta
8	gi 183222463	LEPBI_I3117	45801	165	8(6)	+ (0.84)	-	-	C	alcohol dehydrogenase
9	gi 183221701	LEPBI_I2328	12344	179	12(8)	- (0.04)	-	-	ND	putative anti-sigma factor antagonist

Tabela B10 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1). (conctinuação)

10	gi 183222511	LEPBI_I3166	14820	165	4(4)	+	-	-	ND	putative MaoC-like dehydratase
						(0.84)				
11	gi 189913417	LEPBI_II0249	81536	153	8(4)	+	-	-	C	aconitate hydratase
						(0.86)				
12	gi 183221317	LEPBI_I1934	47118	132	4(4)	-	-	-	C	adenylosuccinate synthetase_
13	gi 183221438	LEPBI_I2056	43810	127	8(4)	-	-	-	C	succinyl-CoA synthetase subunit beta
14	gi 183219454	LEPBI_I0027	21272	123	5(2)	-	-	-	P	superoxide dismutase
15	gi 183222072	LEPBI_I2714	27764	120	10(8)	-	-	-	ND	hydroxyethylthiazole kinase
16	gi 183221463	LEPBI_I2081	42608	117	11(7)	-	-	-	C	phosphoglycerate kinase
						(0.05)				
17	gi 183221462	LEPBI_I2080	36348	111	5(2)	-	-	-	C	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
18	gi 183221172	LEPBI_I1786	27716	96	3(3)	-	-	-	C	enoyl-CoA hydratase
						(0.05)				

Tabela B10 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1). (continuação)

19	gi 183220698	LEPBI_I1308	20356	91	3(3)	-	-	-	C	putative acireductone dioxygenase
					(0.06)					
20	gi 183222229	LEPBI_I2880	42933	88	4(4)	-	-	-	C	acyl-CoA dehydrogenase_ Lipid metabolism
21	gi 183219778	LEPBI_I0355	40635	84	8(5)	-	-	-	C	acetyl-CoA acetyltransferase
					(0.32)					
22	gi 183221714	LEPBI_I2343	10301	169	9(3)	-	-	-	C	Chaperonina GROES
23	gi 183219511	LEPBI_I0084	15385	72	8(5)	-	-	-	EX	nucleoside diphosphate kinase
24	gi 189913405	LEPBI_II0237	27626	72	4(2)	-	-	-	C	two-component response regulator
					(0.06)					
25	gi 183221127	LEPBI_I1741	11616	71	2(2)	-	-	-	ND	putative anti-sigma factor antagonist
					(0.05)					
26	gi 189913217	LEPBI_II0044	74877	69	10(4)	-	-	-	C	methylmalonyl-CoA mutase
					(0.06)					
27	gi 183222641	LEPBI_I3296	33607	66	2(2)	-	-	-	C	putative 2-nitropropane dioxygenase
					(0.09)					
28	gi 183221355	LEPBI_I1973	12641	60	7(3)	+	+	-	NC (Ms*)	50S ribosomal protein L7/L12

Tabela B10 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1). (continuação)

29	gi 183220119	LEPBI_I0707	47177	60	4(1)	-	-	-	C	putative acetyl-CoA acetyltransferase
						(0.06)				
30	gi 183221730	LEPBI_I2359	33568	60	1(1)	-	-	-	C	thioredoxin reductase 1
						(0.10)				
31	gi 183220593	LEPBI_I1197	12279	60	7(4)	-	-	-	ND	putative anti-sigma factor antagonist
						(0.10)				
32	gi 183221691	LEPBI_I2316	44520	56	3(1)	-	-	-	C	acetylornithine aminotransferase
						(0.15)				
33	gi 183221033	LEPBI_I1646	31536	51	1(1)	-	-	-	C	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase_
34	gi 183219761	LEPBI_I0338	27448	49	4(1)	-	-	-	C	enoyl-CoA hydratase
						(0.12)				
35	gi 183221976	LEPBI_I2617	33354	47	1(1)	-	-	-	C	30S ribosomal protein S2
						(0.12)				
36	gi 183221291	LEPBI_I1908	25430	41	1(1)	-	-	-	C	putative glutathione S-transferase
						(0.25)				
37	gi 183222472	LEPBI_I3126	18001	41	4(1)	-	-	-	C	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD
						(0.34)				

Tabela B10 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 1). (conclusão)

38	gi 183222253	LEPBI_I2904	18240	40	5(2)	+	-	-	ND	thiol peroxidase
						(0.89)			(MS)	
39	gi 183219429	LEPBI_I0002	41347	39	11)	-	-	-	C	DNA polymerase III subunit beta
40	gi 183220120	LEPBI_I0708	36025	38	2(1)	-	-	-	C	ketol-acid reductoisomerase
						(0.10)				
41	gi 183222723	LEPBI_I3379	68915	34	3(1)	-	-	-	C	molecular chaperone DnaK
						(0.37)				
42	gi 183220530	LEPBI_I1132	32587	32	5(1)	+	-	-	ND	electron transfer flavoprotein subunit alpha
						(0.90)				

Tabela B11 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 2). (continua)

No.	Números de acesso	Nomenclatura do gene	Massa (Da)	Score	Matches	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>				ANOTAÇÃO NO GENOMA
						Secretome 2.0	Signal P 4.0	TatP 1.0	PSORTb V 3.0	
1	gi 183221349	LEPBI_I1966	44012	1071	39(29)	-	-	-	C	elongation factor EF-Tu
2	gi 183222240	LEPBI_I2891	45079	633	35(26)	-	-	-	ND	Isocitrate dehydrogenase (MS*)
3	gi 183220549	LEPBI_I1153	79157	574	33(25)	-	-	-	C	Fator de elongação G
4	gi 183220541	LEPBI_I1144	34800	486	15(14)	-	-	-	ND	malate dehydrogenase
5	gi 183222336	LEPBI_I2989	59596	476	36(21)	+ (0.73)	-	-	C	phosphoenolpyruvate carboxykinase
6	gi 183220531	LEPBI_I1133	27187	412	21(14)	-	-	-	C	electron transfer flavoprotein subunit beta
7	gi 183221701	LEPBI_I2328	12344	179	12(8)	- (0.04)	-	-	ND	putative anti-sigma factor antagonist
8	gi 183219665	LEPBI_I0240	43023	326	20(13)	- (0.45)	-	-	ND	Fatty acid synthase subunit beta
9	gi 183222463	LEPBI_I3117	45801	265	9(9)	+ (0.84)	-	-	C	alcohol dehydrogenase

Tabela B11 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 2). (continuação)

10	gi 189913417	LEPBI_I10249	81536	222	12(11)	+	-	-	C	aconitate hydratase
						(0.86)				
11	gi 183221317	LEPBI_I1934	47118	170	4(4)	-	-	-	C	adenylosuccinate synthetase_
12	gi 183221463	LEPBI_I2081	42608	158	14(8)	-	-	-	C	phosphoglycerate kinase
						(0.05)				
13	gi 183221127	LEPBI_I1741	11616	153	5(4)	-	-	-	ND	putative anti-sigma factor antagonist
						(0.05)				
14	gi 183222072	LEPBI_I2714	27764	149	8(4)	-	-	-	ND	hydroxyethylthiazole kinase
15	gi 183219778	LEPBI_I0355	40635	142	7(4)	-	-	-	C	acetyl-CoA acetyltransferase
						(0.32)				
16	gi 183222229	LEPBI_I2880	42933	138	6(4)	-	-	-	C	acyl-CoA dehydrogenase_ Lipid metabolism
17	gi 183221438	LEPBI_I2056	43810	125	8(4)	-	-	-	C	succinyl-CoA synthetase subunit beta
18	gi 183219454	LEPBI_I0027	21272	124	6(4)	-	-	-	P	superoxide dismutase
19	gi 183221462	LEPBI_I2080	36348	113	6(3)	-	-	-	C	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Tabela B11 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 2). (continuação)

20	gi 183221172	LEPBI_I1786	27716	110	4(3)	- (0.05)	-	-	C	enoyl-CoA hydratase
21	gi 183222511	LEPBI_I3166	14820	101	2(2)	+ (0.84)	-	-	ND	putative MaoC-like dehydratase
22	gi 189913217	LEPBI_II0044	74877	94	13(5)	- (0.06)	-	-	C	methylmalonyl-CoA mutase
23	gi 189913405	LEPBI_II0237	27626	85	2(2)	- (0.06)	-	-	C	two-component regulator response
24	gi 183221714	LEPBI_I2343	10301	76	6(2)	-	-	-	C	Chaperonina GROES
25	gi 183219511	LEPBI_I0084	15385	71	9(4)	-	-	-	EX	nucleoside diphosphate kinase
26	gi 183220558	LEPBI_I1162	32528	70	3(1)	- (0.08)	-		C	cysteine synthase A
27	gi 183222472	LEPBI_I3126	18001	64	6(4)	- (0.34)	-	-	C	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD
28	gi 183220593	LEPBI_I1197	12279	64	5(3)	- (0.10)	-	-	ND	putative anti-sigma factor antagonist
29	gi 183219429	LEPBI_I0002	41347	62	4(3)	-	-	-	C	DNA polymerase III subunit beta

Tabela B11 - Lista das proteínas identificadas em solução de *L. biflexa* sorovar Patoc, crescida em meio EMJH enriquecido com soro, identificadas por LC/MS/MS e analisadas pelo programa MASCOT (AMOSTRA BSA 2) (conclusão)

30	gi 183220698	LEPBI_I1308	20356	62	3(3)	- (0.06)	-	-	C	putative acireductone dioxygenase
31	gi 183221976	LEPBI_I2617	33354	62	2(2)	- (0.12)	-	-	C	30S ribosomal protein S2
32	gi 183221692	LEPBI_I2317	38703	60	2(1)	- (0.05)	-	-	C	3-isopropylmalate dehydrogenase
33	gi 183220856	LEPBI_I1469	56364	54	4(4)	- (0.06)	-	-	C	bifunctional phosphoribosylaminoimidazol ecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
34	gi 183221691	LEPBI_I2316	44520	53	3(2)	- (0.15)	-	-	C	acetylornithine aminotransferase
35	gi 183220119	LEPBI_I0707	47177	52	9(3)	- (0.06)	-	-	C	putative acetyl-CoA acetyltransferase
36	gi 183221355	LEPBI_I1973	12641	60	7(3)	+	+	-	NC (Ms*)	50S ribosomal protein L7/L12
37	gi 183222723	LEPBI_I3379	68915	51	3(2)	- (0.37)	-	-	C	molecular chaperone DnaK

APÊNDICE C - Lista de proteínas comparadas qualitativamente usando a ferramenta de bioinformática BlasP

Tabela C1 - Lista de proteínas com sequência sinal Sec-dependente indentificada no extrato de proteínas extracelulares de *L. interrogans* e similaridade com proteínas de *L. biflexa* identificadas a partir do *software* BlastP (continua)

<i>L. interrogans</i>	<i>L. biflexa</i> Patoc Patoc 1 (Paris)	similaridade	Valor-e
GI:45655978 Gene: LIC10064 proteína hipotética	GI:183222590 Gene: LEPBI_I3245 Proteína hipotética Provável peptídeo sinal	96%	2e-38
Score = 129 bits (323), Expect = 2e-38, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 65/157 (41%), Positives = 98/157 (62%), Gaps = 3/157 (2%)			
GI:45656096 Gene: LIC10191 proteína hipotética OmpA	GI:183222494 Gene: LEPBI_I3149 Proteína hipotética OmpA	95%	4e-68
core = 207 bits (526), Expect = 4e-68, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 105/186 (56%), Positives = 135/186 (73%), Gaps = 3/186 (2%)			
GI:45657230 Gene: LIC11352 Lipoproteína LipL32	GI:183221614 Gene: LEPBI_I2238 Proteína hipotética	29%	0.031
Score = 32.0 bits (71), Expect = 0.031, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 20/83 (24%), Positives = 41/83 (49%), Gaps = 5/83 (6%)			
GI: 45656646 Gene: LIC10752 Proteína ribossomal 50S L7/L12	GI: 183221355 Gene: LEPBI_I1973 Proteína ribossomal 50S L7/L12 putative EF-Tu interaction site	100%	2e-43
Score = 139 bits (350), Expect = 2e-43, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 97/127 (76%), Positives = 108/127 (85%), Gaps = 1/127 (1%)			
GI: 45658793 Gene: 12966 Lipoproteína - LipL41	GI: 183221900 Gene: LEPBI_I2539 Proteína hipotética	33%	0.045
Score = 32.0 bits (71), Expect = 0.045, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 30/124 (24%), Positives = 59/124 (48%), Gaps = 24/124 (19%)			
GI:45656311 Gene: LIC10411 proteína hipotética	GI: 83220646 Gene: LEPBI_I1254 Proteína HEAT-like	54%	4e-05
Score = 39.7 bits (91), Expect = 4e-05, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 28/85 (33%), Positives = 46/85 (54%), Gaps = 1/85 (1%)			
GI:45656218 Gene: LIC10314 Proteína hipotética Borrelia_P83	GI: 183221736 Gene: LEPBI_I2365 Provável peptídeo sinal Borrelia_P83	99%	7e-113
Score = 348 bits (892), Expect = 7e-113, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 230/587 (39%), Positives = 347/587 (59%), Gaps = 67/587 (11%)			
GI:45658886 Gene: LIC13060 Lipoproteína - LipL36	GI:183222439 Gene: LEPBI_I3093 Proteína hipotética	25%	0.44
Score = 28.5 bits (62), Expect = 0.44, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 23/106 (22%), Positives = 43/106 (41%), Gaps = 21/106 (20%)			

Tabela C1 - Lista de proteínas com sequencia sinal Sec-dependente indentificada no extrato de proteínas extracelulares de *L. interrogans* e similaridade com proteínas de *L. biflexa* identificadas a partir do *software* BlastP.
(conclusão)

GI:45659174	GI:183222385	99%	7e-42
Gene:LIC13355	Gene:LEPBI_I3039		
Lipoproteína	Provável peptídeo sinal		
Score = 145 bits (365), Expect = 7e-42, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 107/291 (37%), Positives = 157/291 (54%), Gaps = 26/291 (9%)			
GI:45656896	GI:183221589	14%	1.1
Gene:LIC11009	Gene:LEPBI_I2211		
Proteína hipotética	Proteína hipotética		
Score = 26.6 bits (57), Expect = 1.1, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 12/35 (34%), Positives = 19/35 (54%), Gaps = 0/35 (0%)			
GI:45656890	GI:183221700	85%	5e-90
Gene:LIC11003	Gene:LEPBI_I2327		
Lipoproteína - LipL71	Provável ATPase		
Score = 285 bits (730), Expect = 5e-90, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 184/479 (38%), Positives = 285/479 (59%), Gaps = 20/479 (4%)			
GI:45655964	GI:183222583	99%	0,0
Gene:LIC10050	Gene:LEPBI_I3238		
Proteína hipotética	Provável Omp		
Score = 578 bits (1489), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 321/729 (44%), Positives = 436/729 (60%), Gaps = 109/729 (15%)			
GI:45658813	GI:183222729	13%	0.032
Gene:LIC2986	Gene:LEPBI_I3385		
Proteína hipotética	Proteína PII - uridiltransferase		
Score = 33.9 bits (76), Expect = 0.032, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 25/94 (27%), Positives = 39/94 (41%), Gaps = 8/94 (9%)			

Tabela C2 - Lista de proteínas com sequencia sinal Sec-dependente indentificada no extrato de proteínas extracelulares de *L. biflexa* e similaridade com proteínas de *L. interrogans* identificadas a partir do *software* BlastP.

(continua)

<i>L. biflexa</i> Patoc Patoc 1 (Paris)	<i>L. interrogans</i> . Copenhageni - L1-130	similaridade	Valor-e
GI:183220671 Gene: LEPBI_I1281 Carbamoil fosfato sintetase	GI:45658713 Gene: LIC12883 Carbamoil fosfato sintetase	99%	0,0
Score = 1768 bits (4580), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 830/1100 (75%), Positives = 974/1100 (89%), Gaps = 0/1100 (0%)			
GI:183220655 Gene: LEPBI_I1973 Adesina Transportadora ABC	GI:45656221 Gene: LIC10317 Isomerase B da ribose 5-fosfato	38%	2,6
Score = 25.8 bits (55), Expect = 2.6, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 10/26 (38%), Positives = 16/26 (62%), Gaps = 0/26 (0%)			
GI:183221355 Gene: LEPBI_I1973 Proteína ribosomal 50S L7/L12 putative EF-Tu interaction site	GI: 45656646 Gene: LIC10752 Proteína ribosomal 50S L7/L12	99%	1e-43
Score = 139 bits (351), Expect = 1e-43, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 97/127 (76%), Positives = 108/127 (85%), Gaps = 1/127 (1%)			
GI: 183220863 Gene: LEPBI_I1476 Transportador ABC ligante ao substrato	GI: 4565 Gene: LIC11641 Proteína hipotética	28%	0,13
Score = 30.8 bits (68), Expect = 0.13, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 29/99 (29%), Positives = 46/99 (46%), Gaps = 13/99 (13%)			
GI: 183220390 Gene: LEPBI_I0986 Proteína hipotética	GI: 45655695 Gene: LIC20112 Proteína periplasmática homóloga LipL45	96%	2e-37
Score = 131 bits (329), Expect = 2e-37, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 84/240 (35%), Positives = 131/240 (55%), Gaps = 14/240 (6%)			
GI: 183222206 Gene: LEPBI_I2857 Proteína hipotética	GI:4565 Gene: LIC10502 Proteína hipotética	37%	1,5
Score = 26.2 bits (56), Expect = 1.5, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 17/73 (23%), Positives = 36/73 (49%), Gaps = 4/73 (5%)			
GI: 183222811 Gene: LEPBI_I3472 Transportador ABC ligada ao ATP	GI:45656430 Gene: LIC10532 Transportador ABC ligada ao ATP	90%	1e-91
Score = 295 bits (756), Expect = 1e-91, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 186/549 (34%), Positives = 295/549 (54%), Gaps = 19/549 (3%)			
GI:183222206 Gene: LEPBI_I2857 Proteína hipotética	GI:45656400 Gene: LIC10502 Proteína hipotética	37%	1,5
Score = 26.2 bits (56), Expect = 1.5, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 17/73 (23%), Positives = 36/73 (49%), Gaps = 4/73 (5%)			

Tabela C2 - Lista de proteínas com sequência sinal Sec-dependente indentificada no extrato de proteínas extracelulares de *L. biflexa* e similaridade com proteínas de *L. interrogans* identificadas a partir do software BlastP.

(conclusão)			
GI:183222384	GI:45657091	44%	0,061
Gene:LEPBI_I3038	Gene:LIC11207		
Proteína hipotética			
Score = 30.4 bits (67), Expect = 0.061, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 28/94 (30%), Positives = 41/94 (44%), Gaps = 3/94 (3%)			
GI:183221499	GI:45657748	90%	2e-134
Gene:LEPBI_I2117	Gene:LIC11885		
Proteína hipotética	Lipoproteína		
Score = 393 bits (1009), Expect = 2e-134, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 204/374 (55%), Positives = 272/374 (73%), Gaps = 8/374 (2%)			
GI:183222028	GI:45658876	73%	7e-91
Gene:LEPBI_I2670	Gene:LIC13050		
Proteína hipotética	Proteína hipotética		
Score = 278 bits (710), Expect = 7e-91, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 138/265 (52%), Positives = 192/265 (72%), Gaps = 2/265 (1%)			
GI:183222590	GI:45655978	89%	2e-38
Gene:LEPBI_I3245	Gene:LIC10064		
Proteína hipotética	Proteína hipotética		
Provável peptídeo sinal			
Score = 129 bits (323), Expect = 2e-38, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 65/157 (41%), Positives = 98/157 (62%), Gaps = 3/157 (2%)			
GI:183220806	GI:45658615	92%	2e-05
Gene:LEPBI_I1417	Gene:LIC12784		
Proteína hipotética	Lipoproteína		
Score = 36.6 bits (83), Expect = 2e-05, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 30/91 (33%), Positives = 45/91 (49%), Gaps = 7/91 (8%)			
GI:183222216	GI:45655754	5%	0,29
Gene:LEPBI_I2867	Gene:LIC20172		
Proteína hipotética	Lipoproteína		
Score = 32.0 bits (71), Expect = 0.29, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 20/68 (29%), Positives = 29/68 (43%), Gaps = 7/68 (10%)			

Tabela C3 - Lista de proteínas secretadas por mecanismos não clássicos indentificada no extrato de proteínas extracelulares de *L. interrogans* e similaridade com proteínas de *L. biflexa* identificadas a partir do software BlastP

(continua)

<i>L. interrogans</i>	<i>L. biflexa</i> Patoc Patoc 1 (Paris)	similaridade	Valor-e
GI:45658174 Gene: LIC12326 Proteína hipotética	GI:183220061 Gene: LEPBI_I0648 Proteína hipotética	52%	0,022
core = 25.8 bits (55), Expect = 0.022, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 17/67 (25%), Positives = 36/67 (54%), Gaps = 4/67 (6%)			
GI:45656214 Gene: LIC10310 Proteína H do sistema clivagem de glicina	GI:183222534 Gene: LEPBI_I3189 Proteína H do sistema clivagem de glicina	100%	8e-60
Score = 181 bits (459), Expect = 8e-60, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 85/130 (65%), Positives = 106/130 (82%), Gaps = 0/130 (0%)			
GI:45656733 Gene: LIC10842 Di-hidro-dipicolinato sintase	GI:183220145 Gene: LEPBI_I0733 Di-hidro-dipicolinato sintase	95%	2e-150
Score = 425 bits (1093), Expect = 2e-150, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 201/292 (69%), Positives = 242/292 (83%), Gaps = 0/292 (0%)			
GI:304570499 Gene: LIC12323 3-oxoacil sintase	GI:183222031 Gene: LEPBI_I2673	8%	0,054
Score = 26.2 bits (56), Expect = 0.054, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 11/27 (41%), Positives = 15/27 (56%), Gaps = 0/27 (0%)			
GI:45659137 Gene: LIC13318 Ácido graxo sintase - sub Beta	GI:183219665 Gene: LEPBI_I0240 Ácido graxo sintase - sub Beta	99%	1e-142
Score = 412 bits (1060), Expect = 1e-142, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 206/389 (53%), Positives = 276/389 (71%), Gaps = 6/389 (2%)			
GI:45658181 Gene: LIC12335 Serino hidroximetiltransferase	GI:183220410 Gene: LEPBI_I1006 Serino hidroximetiltransferase	100%	0,0
Score = 700 bits (1806), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 337/415 (81%), Positives = 370/415 (89%), Gaps = 0/415 (0%)			
GI:45658468 Gene: LIC12631 Hemolisina	GI:183221328 Gene: LEPBI_I1945 Preproteína translocase- SecY	5%	1,1
Score = 28.1 bits (61), Expect = 1.9, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 11/35 (31%), Positives = 20/35 (57%), Gaps = 0/35 (0%)			
GI:45656765 Gene: LIC10874 Molibdopterina oxirredutase	GI:183220758 Gene: LEPBI_I1369 Provável Molibdopterina oxirredutase	100%	0,0
Score = 1264 bits (3271), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 622/1062 (59%), Positives = 784/1062 (74%), Gaps = 48/1062 (5%)			
GI:161621774 Gene: LIC11781 Malato desidrogenase	GI: 183220541 Gene: LEPBI_I1144 Malato desidrogenase	100%	0,0
Score = 508 bits (1307), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 260/326 (80%), Positives = 290/326 (89%), Gaps = 0/326 (0%)			

Tabela C3 - Lista de proteínas secretadas por mecanismos não clássicos indentificada no extrato de proteínas extracelulares de *L. interrogans* e similaridade com proteínas de *L. biflexa* identificadas a partir do *software* BlastP

(continuação)

GI:45656423	GI: 183222724	86%	1e-64
Gene: LIC10525	Gene: LEPBI_I3380		
Proteína choque térmico GroE	Proteína choque térmico GroE		
Score = 199 bits (506), Expect = 1e-64, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 96/184 (52%), Positives = 133/184 (72%), Gaps = 3/184 (2%)			
GI:45656422	GI: 183222723	100%	0,0
Gene: LIC10524	Gene: LEPBI_I 3379		
Proteína choque térmico DnaK	Proteína choque térmico DnaK		
Score = 1038 bits (2683), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 523/646 (81%), Positives = 577/646 (89%), Gaps = 2/646 (0%)			
GI:45657374	GI: 183222068	71%	2e-27
Gene: LIC11499	Gene: LEPBI_I2710		
Proteína hipotética	Proteína hipotética		
Score = 94.7 bits (234), Expect = 2e-27, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 43/57 (75%), Positives = 54/57 (95%), Gaps = 0/57 (0%)			
GI:45658540	GI: 183220912	70%	0,0
Gene: LIC12705	Gene: LEPBI_I1525		
Fator de início da tradução (IF2)	Fator de início da tradução (IF2)		
Score = 936 bits (2420), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 455/630 (72%), Positives = 543/630 (86%), Gaps = 9/630 (1%)			
GI:45657317	GI: 183222597	20%	1e-09
Gene: LIC11441	Gene: LEPBI_I3252		
Proteína hipotética	Proteína hipotética		
Score = 50.8 bits (120), Expect = 1e-09, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 16/33 (48%), Positives = 25/33 (76%), Gaps = 0/33 (0%)			
GI:45659173	GI:183220939	24%	0,69
Gene: LIC13354	Gene: LEPBI_I1552		
Proteína hipotética	Proteína hipotética		
Score = 28.1 bits (61), Expect = 0.69, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 22/64 (34%), Positives = 33/64 (52%), Gaps = 5/64 (8%)			
GI:45656973	GI:183222467	97%	3e-40
Gene: LIC11089	Gene: LEPBI_I3121		
Proteína hipotética	Provável peptídeo sinal		
Score = 141 bits (356), Expect = 3e-40, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 99/309 (32%), Positives = 151/309 (49%), Gaps = 33/309 (11%)			
GI:45655777	GI:189913255	99%	2e-112
Gene: LIC20197	Gene: LEPBI_II0082		
Cisteína protease	Peptídeo sinal		
Score = 361 bits (927), Expect = 2e-112, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 240/809 (30%), Positives = 413/809 (51%), Gaps = 34/809 (4%)			
GI:45659283	GI:18322	70%	2e-21
Gene: LIC13467	Gene: LEPBI_I		
Proteína hipotética	Proteína hipotética		
Score = 92.0 bits (227), Expect = 2e-21, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 55/128 (43%), Positives = 75/128 (59%), Gaps = 21/128 (16%)			
GI:45657553	GI:183220480	18%	1,6
Gene: LIC11687	Gene: LEPBI_I1079		
Fosfolipase dependente de zinco	Provável regulador de resposta		
Score = 26.2 bits (56), Expect = 1.6, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 19/64 (30%), Positives = 31/64 (48%), Gaps = 9/64 (14%)			

Tabela C3 - Lista de proteínas secretadas por mecanismos não clássicos indentificada no extrato de proteínas extracelulares de *L. interrogans* e similaridade com proteínas de *L. biflexa* identificadas a partir do software BlastP

(conclusão)			
GI:45656736	GI: 183220148	97%	2e-90
Gene: LIC10845	Gene: LEPBI_I0736		
Proteína hipotética	Proteína hipotética		
Score = 275 bits (704), Expect = 2e-90, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 142/342 (42%), Positives = 221/342 (65%), Gaps = 6/342 (2%)			
GI:45656263	GI: 183220530	100%	3e-173
Gene: LIC10360	Gene: LEPBI_I 1132		
Flavoproteína	Flavoproteína		
Score = 484 bits (1247), Expect = 3e-173, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 237/319 (74%), Positives = 276/319 (87%), Gaps = 0/319 (0%)			
GI:45655785	GI: 189913269	78%	3e-55
Gene: LIC20205	Gene: LEPBI_I I0098		
Proteína hipotética	Proteína hipotética		
Score = 179 bits (455), Expect = 3e-55, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 102/226 (45%), Positives = 148/226 (65%), Gaps = 10/226 (4%)			
GI:45655824	GI: 189913417	98%	0.0
Gene: LIC20249	Gene: LEPBI_II0249		
Aconitase	Aconitase		
Score = 1216 bits (3145), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 579/749 (77%), Positives = 644/749 (86%), Gaps = 0/749 (0%)			
GI:45658609	GI: 183221159	99%	7e-36
Gene: LIC12776	Gene: LEPBI_I 1773		
Proteína ribossomal 50S, L21	Proteína ribossomal 50S, L21		
Score = 118 bits (295), Expect = 7e-36, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 62/103 (60%), Positives = 83/103 (81%), Gaps = 1/103 (1%)			
GI:45656498	GI: 183222511	100%	2e-66
Gene: LIC10600	Gene: LEPBI_I3166		
ácido graxo sintase	Provável Mao-C - desidratase		
Score = 198 bits (504), Expect = 2e-66, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 98/138 (71%), Positives = 116/138 (84%), Gaps = 0/138 (0%)			
GI:45657938	GI: 183221462	100%	0.0
Gene: LIC12090	Gene: LEPBI_I2080		
Gliceroaldeído-3-fosfato-desidrogenase	Gliceroaldeído3-fosfato-desidrogenase		
Score = 594 bits (1531), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 286/335 (85%), Positives = 305/335 (91%), Gaps = 0/335 (0%)			
GI:45658671	GI:183220431	100%	0.0
Gene: LIC12841	Gene: LEPBI_I1028		
Di-aminopimelato aminotransferase	Di-aminopimelato aminotransferase		
Score = 638 bits (1646), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 309/408 (76%), Positives = 353/408 (87%), Gaps = 0/408 (0%)			

Tabela C4 - Lista de proteínas secretadas por mecanismos não clássicos indentificada no extrato de proteínas extracelulares de *L. biflexa* e similaridade com proteínas de *L. interrogans* identificadas a partir do software BlastP

(continua)

<i>L. biflexa</i> Patoc Patoc 1 (Paris)	<i>L. interrogans</i> . Copenhageni - L1-130	similaridade	Valor-e
GI:189913417 Gene: LEPBI_II0249 Acomitato hidratase	GI:45655824 Gene: LIC20249 Acomitato hidratase	99%	0.0
Score = 1216 bits (3145), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 579/749 (77%), Positives = 644/749 (86%), Gaps = 0/749 (0%)			
GI:183222336 Gene: LEPBI_I2989 Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	GI:45656121 Gene: LIC10216 Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	99%	0.0
Score = 891 bits (2303), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 416/528 (79%), Positives = 467/528 (88%), Gaps = 0/528 (0%)			
GI:183220372 Gene: LEPBI_Ia0966 Chaperona trigger fator 1	GI: 45657292 Gene: LIC11416 Chaperona trigger fator 1	100%	1e-117
Score = 353 bits (905), Expect = 1e-117, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 189/449 (42%), Positives = 276/449 (61%), Gaps = 2/449 (0%)			
GI:183221095 Gene: LEPBI_I1709 Provável Protease PmbA	GI: 45657606 Gene: LIC11740 Proteína hipotética (PmbA)	96%	2e-27
Score = 110 bits (275), Expect = 2e-27, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 114/456 (25%), Positives = 210/456 (46%), Gaps = 24/456 (5%)			
GI: 183220196 Gene: LEPBI_I0786 Acil-desidratase	GI: 45657237 Gene: LIC11359 proteína hipotética	97%	0.0
Score = 628 bits (1620), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 289/384 (75%), Positives = 335/384 (87%), Gaps = 0/384 (0%)			
GI: 183219941 Gene: LEPBI_I0523 Serina endopeptidase	GI:45658643 Gene: LIC12812 Serina protease	98%	7e-137
Score = 397 bits (1020), Expect = 7e-137, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 209/392 (53%), Positives = 271/392 (69%), Gaps = 17/392 (4%)			
GI: 183219454 Gene: LEPBI_I0027 Superóxido dismutase	GI:45656962 Gene: LIC11078 Proteína hipotética	25%	0.20
Score = 28.5 bits (62), Expect = 0.20, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 18/49 (37%), Positives = 24/49 (49%), Gaps = 2/49 (4%)			
GI:183220847 Gene: LEPBI_I1460 Proteína hipotética	GI 45657515 Gene: LIC11643 Proteína hipotética LipL45	100%	5e-129
Score = 377 bits (969), Expect = 5e-129, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 219/400 (55%), Positives = 288/400 (72%), Gaps = 17/400 (4%)			
GI:189913316 Gene: LEPBI_II0146 Peroxidase	GI:45657102 Gene: LIC11219 Peroxiredoxina	77%	1e-23
Score = 92.4 bits (228), Expect = 1e-23, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 55/175 (31%), Positives = 87/175 (50%), Gaps = 9/175 (5%)			

Tabela C4 - Lista de proteínas secretadas por mecanismos não clássicos indentificada no extrato de proteínas extracelulares de *L. biflexa* e similaridade com proteínas de *L. interrogans* identificadas a partir do *software* BlastP

(continuação)

GI:183222534 Gene:LEPBI_I3189 Proteína H sistema clivagem da glicina	GI:45656214 Gene:LIC10310 Proteína H sistema clivagem glicina	100%	8e-60
Score = 181 bits (459), Expect = 8e-60, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 85/130 (65%), Positives = 106/130 (82%), Gaps = 0/130 (0%)			
GI:183222511 Gene:LEPBI_I3166 Provável Mao-C-like - desidrogenase	GI:45659101 Gene:LIC13280 Provável Mao-C-like - desidrogenase	94%	3e-06
Score = 40.8 bits (94), Expect = 3e-06, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 34/134 (25%), Positives = 61/134 (46%), Gaps = 6/134 (4%)			
GI:183222771 Gene:LEPBI_I3430 Proteína hipotética	GI:45655735 Gene:LIC20153 Proteína hipotética	68%	1e-06
Score = 44.7 bits (104), Expect = 1e-06, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 46/184 (25%), Positives = 81/184 (44%), Gaps = 30/184 (16%)			
GI:183222142 Gene:LEPBI_I2785 Proteína hipotética	GI:45658294 Gene:LIC12451 Prefenato desidratase	31%	1.3
Score = 24.6 bits (52), Expect = 1.3, Method: Composition-based stats. Identities = 9/29 (31%), Positives = 15/29 (52%), Gaps = 0/29 (0%)			
GI:183222463 Gene:LEPBI_I3117 Álcool desidrogenase	GI: 45656158 Gene: LIC10253 Álcool desidrogenase	100%	0.0
Score = 705 bits (1820), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 341/415 (82%), Positives = 377/415 (91%), Gaps = 0/415 (0%)			
GI:183220361 Gene:LEPBI_I0957 Proteína hipotética	GI:45656140 Gene:LIC10235 Proteína hipotética	89%	2e-35
Score = 116 bits (291), Expect = 2e-35, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 52/93 (56%), Positives = 69/93 (74%), Gaps = 0/93 (0%)			
GI:183219477 Gene:LEPBI_I0050 3-oxoacyl-ACP reductase	GI:45656598 Gene:LIC10700 3-oxoacyl-ACP reductase	100%	4e-151
Score = 423 bits (1088), Expect = 4e-151, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 202/255 (79%), Positives = 233/255 (91%), Gaps = 0/255 (0%)			
GI:183219973 Gene:LEPBI_I0555 Proteína hipotética	GI:45658943 Gene:LIC13120 Di-guanilato fosfodiesterase	66%	0.29
Score = 26.9 bits (58), Expect = 0.29, Method: Composition-based stats. Identities = 25/79 (32%), Positives = 34/79 (43%), Gaps = 12/79 (15%)			

Tabela C4 - Lista de proteínas secretadas por mecanismos não clássicos indentificada no extrato de proteínas extracelulares de *L. biflexa* e similaridade com proteínas de *L. interrogans* identificadas a partir do *software* BlastP

(conclusão)			
GI:183220541	GI:161621774	99%	0.0
Gene:LEPBI_I1144	Gene:LIC11781		
Malato desidrogenase	Malato desidrogenase		
Score = 530 bits (1366), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 260/326 (80%), Positives = 290/326 (89%), Gaps = 0/326 (0%)			
GI:183222724	GI:45656423	81%	4e-64
Gene:LEPBI_I3380	Gene:LIC10525		
Proteína choque térmico - GrpE	Proteína choque térmico - GrpE		
Score = 197 bits (501), Expect = 4e-64, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 88/154 (57%), Positives = 119/154 (77%), Gaps = 0/154 (0%)			
GI:183221439	GI:45658412	99%	4e-177
Gene:LEPBI_I2057	Gene:LIC12574		
Succinil-CoA sintetase	Succinil-CoA sintetase		
Score = 492 bits (1267), Expect = 4e-177, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 240/294 (82%), Positives = 262/294 (89%), Gaps = 4/294 (1%)			
GI:183222072	GI:45656691	94%	1e-60
Gene:LEPBI_I2714	Gene:LIC10800		
Hidroxi-etil-tiazol quinase	Hidroxi-etil-tiazol quinase		
Score = 193 bits (490), Expect = 1e-60, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 113/252 (45%), Positives = 148/252 (59%), Gaps = 1/252 (0%)			

Tabela C5 - Lista de proteínas preditas como extracelulares pelo programa PSORTb 3.0 identificadas no extrato de proteínas extracelulares de *L. interrogans* e similaridade com proteínas de *L. biflexa* identificadas a partir do software BlastP.

<i>L. interrogans</i> . Copenhageni - L1-130	<i>L. biflexa</i> Patoc Patoc 1 (Paris)	similaridade	Valor-e
GI: 45658468 Gene: LIC12631 Hemolisina	GI:183221328 Gene:LEPBI_I1945 Pre-proteína translocase	5%	1.9
Score = 28.1 bits (61), Expect = 1.9, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 11/35 (31%), Positives = 20/35 (57%), Gaps = 0/35 (0%)			
GI: 45657338 Gene: LIC11463 Provável esterase/lipase	GI: 183221113 Gene:LEPBI_I1727 Provável peptídeo sinal (esterase/lípase)	86%	2e-36
Score = 134 bits (338), Expect = 2e-36, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 104/324 (32%), Positives = 160/324 (49%), Gaps = 24/324 (7%)			
GI: 45656816 Gene: LIC10927 Pectinacetilesterase	GI: 189913392 Gene: LEPBI_II0224 Proteína hipotética	4%	2.5
Score = 26.9 bits (58), Expect = 2.5, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 13/22 (59%), Positives = 16/22 (73%), Gaps = 2/22 (9%)			
GI: 45658083 Gene: LIC12234 Proteína hipotética	GI:183221664 Gene:LEPB_I2289 Proteína hipotética	80%	5e-11
Score = 55.8 bits (133), Expect = 5e-11, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 44/100 (44%), Positives = 58/100 (58%), Gaps = 0/100 (0%)			
GI: 45657379 Gene: LIC11504 Proteína hipotética	GI:183221664 Gene:LEPBI_I2289 Proeína hipotética	71%	3e-15
Score = 69.3 bits (168), Expect = 3e-15, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 53/178 (30%), Positives = 98/178 (55%), Gaps = 4/178 (2%)			
GI: 45658813 Gene: LIC12986 Proteína hipotética	GI:183222729 LEPBI_I3385 Uridilil transferase	13%	0.032
Score = 33.9 bits (76), Expect = 0.032, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 25/94 (27%), Positives = 39/94 (41%), Gaps = 8/94 (9%)			

Tabela C6 - Lista de proteínas preditas como extracelulares pelo programa PSORTb 3.0 identificadas no extrato de proteínas extracelulares de *L. biflexa* e similaridade com proteínas de *L. interrogans* identificadas a partir do software BlastP.

<i>L. interrogans</i> . Copenhageni - L1-130	<i>L. biflexa</i> Patoc Patoc 1 (Paris)	similaridade	Valor-e
GI: 183222384 Gene: LEPBI_I3038 Proteína hipotética	GI:45657091 Gene:LIC11207 Lipoproteína	44%	0.061
Score = 30.4 bits (67), Expect = 0.061, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 28/94 (30%), Positives = 41/94 (44%), Gaps = 3/94 (3%)			
GI: 183222771 Gene: LEPBI_I3430 Proteína hipotética	GI:45655735 Gene:LIC20153 Proteína hipotética	68%	1e-06
Score = 44.7 bits (104), Expect = 1e-06, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 46/184 (25%), Positives = 81/184 (44%), Gaps = 30/184 (16%)			
GI: 183222216 Gene: LEPBI_I2867 Proteína hipotética	GI:45655754 Gene:LIC20172 Provável lipoproteína	5%	0.29
Score = 32.0 bits (71), Expect = 0.29, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 20/68 (29%), Positives = 29/68 (43%), Gaps = 7/68 (10%)			
GI: 183219511 Gene: LEPBI_I0084 Quinase nucleosídeo difosfato	GI:45655754 Gene:LIC20172 Provável lipoproteína	100%	0.0
Score = 1408 bits (3644), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 717/717 (100%), Positives = 717/717 (100%), Gaps = 0/717 (0%)			