

KAMILA OLIVEIRA NUNES

**Caracterização funcional de quatro termolisinas presentes nas espécies
patogênicas de *Leptospira***

São Paulo

2021

KAMILA OLIVEIRA NUNES

Caracterização funcional de quatro termolisinas presentes nas espécies patogênicas de *Leptospira*

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Angela Silva Barbosa

De acordo:



Orientador

São Paulo
2021

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

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 4027
FMVZ

Nunes, Kamila Oliveira

Caracterização funcional de quatro termolisinas presentes nas espécies patogênicas de *Leptospira* / Kamila Oliveira Nunes. – 2021.
75 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2021.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Silva Barbosa.

1. Termolisina. 2. *Leptospira*. 3. Metaloprotease. 4. Protease. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: **NUNES, Kamila Oliveira**

Título: **Caracterização funcional de quatro termolisinas presentes nas espécies patogênicas de *Leptospira***

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 05 de janeiro de 2021
CEUAX N 1956280416

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Angela Silva Barbosa

Área: Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses

Equipe envolvida: Angela Silva Barbosa - (orientador); Kamila Oliveira Nunes - (executante);

Título do projeto: "Caracterização funcional de quatro termolissinas presentes nas espécies patogênicas de Leptospira".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 01/06/2016, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

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

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 5th January 2021

CERTIFIED

We certify that the Research "Functional characterization of four thermolysins present in pathogenic species of *Leptospira*", protocol number CEUAX 1956280416 (ID 000497), under the responsibility Angela Silva Barbosa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day June 01, 2016.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Caracterização funcional de quatro termolisinas presentes nas espécies patogênicas de *Leptospira*", protocolado sob o CEUAX nº 1956280416, sob a responsabilidade de Angela Silva Barbosa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 01 de junho de 2016.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a espiritualidade, que me guiou, orientou e não me fez cair durante estes anos.

Agradeço imensamente a minha orientadora, Dra. Angela Silva Barbosa, que com sua calma, doçura e tamanha sabedoria me guiou até aqui. Este trabalho só foi possível por ela ter acreditado em mim, desde o começo até o final, me dando conselhos, puxões de orelha e conversas felizes e animadas no laboratório e em nossos almoços. Muito obrigada Angel, você é um ser iluminado.

Aos meus amores do laboratório: Matilde, Priscila, Daniella, Letícia, Joana, Aline, Denize e Luan, vocês (todos vocês) foram essenciais para meu amadurecimento neste projeto, e graças a vocês me mantive firme e minha cabeça se manteve saudável (ou - pelo menos – mais ou menos saudável rs) e aos amigos do laboratório vizinho Dra. Claudia Trigo, Claudia Freire, Fernanda e Paulo, vocês são especiais! Amo vocês.

Aos funcionários e colaboradores do laboratório de bacteriologia do Instituto Butantan, em especial Dr. Waldir Pereira Elias Junior, por todo apoio, amizade e alegrias concedidas a mim, desde o tempo do mestrado, a Dra. Márcia Regina Franzolim por seu jeito alegre e sempre prestativo e a Dra. Patrícia Antônia Estima por estar sempre disponível, nos ajudando e animando as conversas do laboratório.

Ao pessoal do VPS: Prof. Dr. Marcos Bryan, Gisele, Israel e Danival por sempre estenderem a mão, ajudar e me acolher, vocês são incríveis.

A Prof. Dra. Lourdes Isaac e seus alunos pelas conversas, risadas e discussões sempre produtivas em nossas reuniões. Ao Prof. Dr. Ricardo Mazzon por ter me auxiliado tanto na construção dos mutantes, muito obrigada!

Aos meus pais, minha fortaleza, Solange e Luigi, sem os quais eu, com certeza, não teria forças para conseguir finalizar este projeto. Vocês são a luz da minha vida, e este trabalho é para vocês.

Aos familiares: vó Dirce, tios, tias, primos (são muitos os nomes) vocês são especiais e eu amo cada um de vocês. Obrigada por estarem comigo sempre.

Aos amigos: Indiara, Guilherme, Dafine, Rodrigo, Raquel, Marcinha e Samuel vocês não sabem o quanto são importantes pra mim. Amo vocês!

Aos meus bebês Menina e Mogli por estarem comigo durante a escrita e estudo dando miados, pedindo sachê e deitando no colo.

E por último, mas não menos importante, ao meu companheiro, melhor amigo, a pessoa que me apoia, suporta e tem o melhor abraço do mundo, Paulo. Te amo minha vida.

Agradeço o apoio financeiro, sem o qual não seria possível a finalização do projeto: processo nº 2016/08997-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	Biologia das bactérias do gênero <i>Leptospira</i>	13
1.2	Epidemiologia	17
1.3	Patogênese	20
1.4	Proteases como fatores de virulência.....	23
2.	OBJETIVOS.....	26
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Estirpes bacterianas e condições de cultivo	27
3.2	Análises <i>in silico</i>	27
3.3	Amplificação dos genes <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> e <i>LIC13321</i>	28
3.4	Eletroforese em gel de agarose	29
3.5	Clonagem dos genes <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> e <i>LIC13321</i> e obtenção de mutantes no sítio catalítico (HEXXH) 29	
3.6	Sequenciamento dos genes clonados no vetor pAE	30
3.7	Expressão e purificação das proteínas recombinantes <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> , <i>LIC13321</i> e mutantes da <i>LIC13322</i> no sítio catalítico HEXXH	31
3.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	32
3.9	Análise da atividade proteolítica das proteínas <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> , <i>LIC13321</i> e <i>LIC13322</i> sobre proteínas do sistema complemento, da matriz extracelular e do plasma	33
3.10	Expressão heteróloga da termolisina <i>LIC13322</i> em <i>L. biflexa</i>	33
3.11	Análise de sobrevivência da <i>L. biflexa/LIC13322</i> em soro humano normal	34
4.	RESULTADOS	36
4.1	Análises <i>in silico</i>	36
4.2	Produção das proteínas recombinantes <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> E <i>LIC13321</i> e mutantes no sítio catalítico HEXXH 39	
4.3	Expressão das proteínas recombinantes	42
4.4	Avaliação da atividade proteolítica das termolisinas codificadas pelas <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> , <i>LIC13321</i> e <i>LIC13322</i> sobre as proteínas do sistema complemento (C3, C3b, C4, C4b, C5, C6, C7, C8 e C9).....	44
4.4.1	Avaliação da atividade proteolítica de diferentes doses das termolisinas recombinantes sobre os diversos substratos.	54
4.5	Avaliação da atividade proteolítica das termolisinas <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> , <i>LIC13321</i> e <i>LIC13322</i> sobre proteínas da matriz extracelular (decorina, biglicam) e fibrinogênio	58
4.6	Introdução do gene <i>LIC13322</i> na espécie não patogênica (<i>L. biflexa</i>).....	62
4.7	Ensaio de resistência ao soro humano	63
5.	DISCUSSÃO.....	65
6.	CONCLUSÕES	68
7.	REFERÊNCIAS	69

RESUMO

NUNES, K.O. **Caracterização funcional de quatro termolisinas presentes nas espécies patogênicas de *Leptospira***. 2021. 75 folhas. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A leptospirose, causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, é uma doença de importância médica e veterinária altamente difundida em todo mundo. Atualmente, as leptospiras são classificadas em mais de 300 sorovares agrupados em 64 espécies distintas (patogênicas e saprófitas). Estas espiroquetas produzem diversas proteases potencialmente capazes de produzir danos nos tecidos. Hoje, sabemos que proteínas presentes no sobrenadante de cultura de estirpes patogênicas são capazes de degradar diversas moléculas do hospedeiro incluindo proteínas da matriz extracelular, da cascata de coagulação e do sistema complemento, contribuindo para os processos de invasão e evasão imune. A análise dos genomas de leptospiras disponíveis nos levou à identificação de quatro termolisinas, presentes somente nas espécies patogênicas, codificadas pelos genes *LIC13320*, *LIC13321*, *LIC13322* e *LIC10715*. Tendo em vista que enzimas da família das termolisinas são fatores cruciais na patogênese de várias doenças causadas por bactérias e representam alvos potenciais para intervenção terapêutica, este projeto teve por objetivo caracterizar funcionalmente essas metaloproteinases de *Leptospira*. As quatro termolisinas de *L. interrogans* foram obtidas na forma recombinante e realizou-se também a expressão heteróloga da termolisina codificada pela *LIC13322* de *L. interrogans* (estirpe patogênica) em *L. biflexa* (estirpe saprófita). Os resultados indicam que as termolisinas de *L. interrogans* são capazes de degradar diversas proteínas envolvidas na ativação do sistema complemento humano, assim como algumas proteínas da matriz extracelular, e devem, portanto, auxiliar a bactéria nos processos de invasão e evasão imune. A expressão heteróloga da *LIC13322* na estirpe saprófita não conferiu resistência ao soro, sugerindo que as termolisinas devem possuir um papel aditivo e certo grau de especificidade de ação.

Palavras chave: Termolisina, *Leptospira*, Metaloprotease, Protease

ABSTRACT

NUNES, K.O. **Functional characterization of four thermolysins present in *Leptospira* pathogenic species.** 2021. 75 folhas. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Leptospirosis, caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*, is a disease of medical and veterinary importance highly widespread worldwide. Currently, leptospirae are classified into more than 300 serovars grouped into 64 distinct species (pathogenic and saprophytic). These spirochetes produce several proteases potentially capable of causing tissue damage. Today, we know that proteins present in the culture supernatant of pathogenic strains are able to degrade several host molecules including proteins from the extracellular matrix, the coagulation cascade and the complement system, contributing to the invasion and immune evasion processes. The analysis of the genomes of leptospirae available led us to the identification of four thermolysins, present only in pathogenic species, encoded by the genes LIC13320, LIC13321, LIC13322 and LIC10715. Bearing in mind that enzymes of the thermolysin family are crucial factors in the pathogenesis of several diseases caused by bacteria and represent potential targets for therapeutic intervention, this project aimed to functionally characterize these *Leptospira* metalloproteinases. The four thermolysins of *L. interrogans* were obtained in recombinant form and the heterologous expression of the thermolysin encoded by LIC13322 of *L. interrogans* (pathogenic strain) was also carried out in *L. biflexa* (saprophyte strain). The results indicate that *L. interrogans* thermolysins are capable of degrading several proteins involved in the activation of the human complement system, as well as some proteins of the extracellular matrix, and should, therefore, assist the bacteria in the processes of immune invasion and evasion. The heterologous expression of LIC13322 in the saprophyte strain did not confer resistance to the serum, suggesting that thermolysins must have an additive role and a certain degree of specificity of action.

Keywords: Thermolysin, *Leptospira*, Metalloproteinase, Proteinase

LISTA DE FIGURAS

▪ Figura 1. Fotomicrografias de <i>Leptospira</i> , iluminação de campo escuro.	13
▪ Figura 2. Morfologia celular e arquitetura do envelope de <i>Leptospira A</i>)	14
▪ Figura 3. <i>Leptospiras</i> no ambiente e no hospedeiro.....	15
▪ Figura 4. Árvore filogenética de <i>Leptospira spp.</i>	16
▪ Figura 5. O ciclo da infecção por leptospirosas.....	18
▪ Figura 6. Natureza bifásica da leptospirose.....	19
▪ Figura 7. Vias de ativação e via terminal do sistema complemento.....	21
▪ Figura 8. Estágios do processo de infecção por <i>Leptospira</i>	23
▪ Figura 9. Localização dos genes que codificam as termolisinas de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	24
▪ Figura 10. Representação esquemática dos domínios das termolisinas.....	25
▪ Figura 11. Análises <i>in silico</i>	37
▪ Figura 12. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento de sequência de aminoácidos das metaloproteinasas de <i>L. interrogans</i> e demais espécies.....	38
▪ Figura 13. Predição da estrutura terciária das quatro termolisinas de <i>L. interrogans</i>	39
▪ Figura 14. Amplificação dos genes <i>LIC10715</i> (1), <i>LIC13320</i> (2), <i>LIC13321</i> (3) por PCR- ...	40
▪ Figura 15. Análise da digestão dos plasmídeos contendo os genes <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> e <i>LIC13321</i> clonados no vetor pGem-T easy com as enzimas XhoI e NcoI e dos mutantes em HEXXH em vetor pUC57 digeridos com enzimas NcoI e KpnI.	41
▪ Figura 16. Clonagem dos genes <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> e <i>LIC13321</i> e mutantes HEXXH no vetor de expressão pAE digerido com as enzimas XhoI e NcoI.....	42
▪ Figura 17. Termolisinas <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> , <i>LIC13321</i> , <i>LIC13322</i> e mutantes AEXXH e HAXXH purificadas.....	43
▪ Figura 18. Atividade proteolítica das termolisinas <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> , <i>LIC13321</i> e <i>LIC13322</i> sobre o componente C3 do sistema complemento humano.....	45
▪ Figura 19. Atividade proteolítica das termolisinas <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> , <i>LIC13321</i> e <i>LIC13322</i> sobre o componente C3b do sistema complemento humano.....	46
▪ Figura 20. Atividade proteolítica das termolisinas <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> , <i>LIC13321</i> e <i>LIC13322</i> sobre o componente C4 e C4b do sistema complemento humano.....	47
▪ Figura 21. Atividade proteolítica das termolisinas <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> , <i>LIC13321</i> e <i>LIC13322</i> sobre o componente C5 do sistema complemento humano.....	49
▪ Figura 22. Atividade proteolítica das termolisinas <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> , <i>LIC13321</i> e <i>LIC13322</i> sobre o componente C6 do sistema complemento humano.....	50
▪ Figura 23. Atividade proteolítica das termolisinas <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> , <i>LIC13321</i> e <i>LIC13322</i> sobre o componente C7 do sistema complemento humano.....	51
▪ Figura 24. Atividade proteolítica das termolisinas <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> , <i>LIC13321</i> e <i>LIC13322</i> sobre o componente C8 do sistema complemento humano.....	52
▪ Figura 25. Atividade proteolítica das termolisinas <i>LIC10715</i> , <i>LIC13320</i> , <i>LIC13321</i> e <i>LIC13322</i> sobre o componente C9 do sistema complemento humano.....	53
▪ Figura 26. Atividade proteolítica das termolisinas <i>LIC13320</i> , <i>LIC13321</i> e <i>LIC13322</i> e mutantes (<i>LIC13322/AEXXH</i> e <i>LIC13322/HAXXH</i>) sobre o componente C3 do sistema complemento humano.....	55
▪ Figura 27. Atividade proteolítica das termolisinas <i>LIC13321</i> e <i>LIC13322</i> e mutantes (<i>LIC13322/AEXXH</i> e <i>LIC13322/HAXXH</i>) sobre o componente C5 do sistema complemento humano.....	56

- Figura 28. Atividade proteolítica da termolisina LIC13322 e mutantes (LIC13322/AEXXH e LIC13322/HAXXH) sobre o componente C6 do sistema complemento humano..... 57
- Figura 29. Atividade proteolítica das termolisinas LIC13320 e LIC13321 e mutantes (LIC13322/AEXXH e LIC13322/HAXXH) sobre o componente C7 do sistema complemento humano..... 58
- Figura 30. Atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre o fibrinogênio. 59
- Figura 31. Atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre o componente biglicam. 60
- Figura 32. Atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre o componente decorina..... 61
- Figura 33. Atividade proteolítica das termolisinas LIC13321 e LIC13322 e mutantes (LIC13322/AEXXH e LIC13322/HAXXH) sobre o componente decorina. 62
- Figura 34. Amplificação do gene *LIC13322* nos transconjugantes *L. biflexa/LIC13322*. 63

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

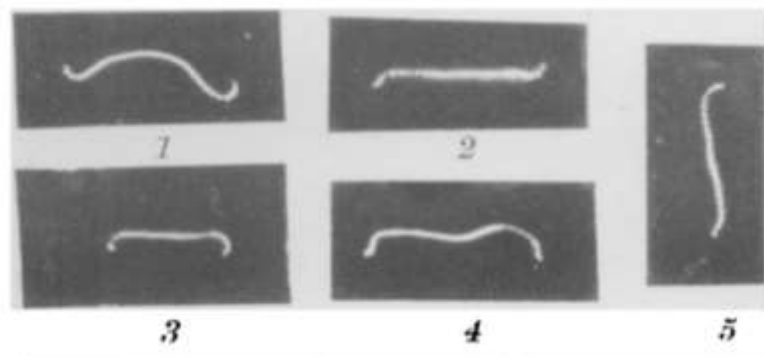
- Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificar os genes LIC10715, LIC13320 e LIC13321 para posterior clonagem em vetor pGEM-T Easy 28
- Tabela 2. Protocolo de coloração por prata de géis de poliacrilamida. 32
- Tabela 3. Degradação de proteínas do sistema complemento por termolisinas 54
- Gráfico 1 - Sobrevivência das estirpes transconjugantes *L. biflexa*/LIC13322 ao soro normal humano. 64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biologia das bactérias do gênero *Leptospira*

Bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira* foram identificadas como agentes causais da síndrome de Weil há cerca de 100 anos por pesquisadores do Japão e da Europa simultaneamente (LEVETT, 2001). Um dos primeiros registros de seu isolamento e identificação está no artigo de WOLBACH e BINGER (1914) no qual os autores relatam o isolamento a partir de um filtrado de água parada, que apresentou-se “ligeiramente turva” após 6 dias em temperatura ambiente. Os pesquisadores foram capazes de visualizar as bactérias isoladas em microscópio de campo escuro, e essas fotografias são mostradas na Figura 1.

Figura 1. Fotomicrografias de *Leptospira*, iluminação de campo escuro.



Fonte: Wolbach e Binger, 1914.

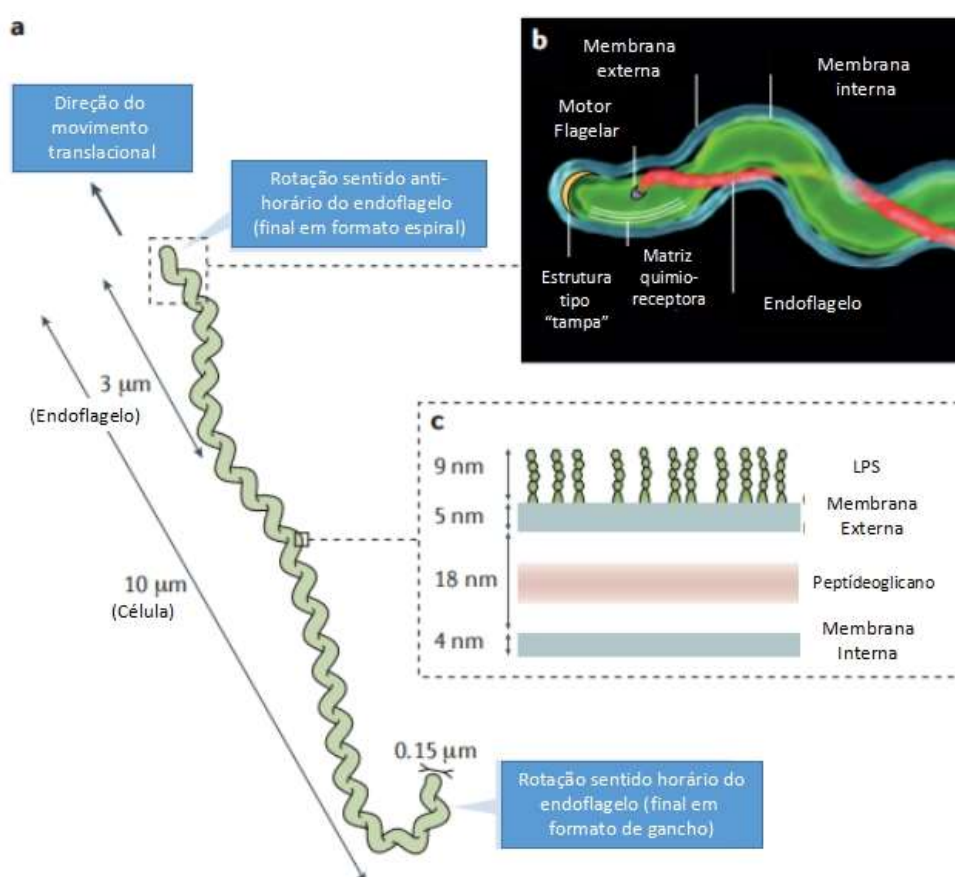
Desde então estas espiroquetas vêm sendo isoladas de quase todas as espécies de mamíferos em todos os continentes, com exceção da Antártica, sendo a leptospirose reconhecida hoje como a zoonose mais difundida no mundo, e a maior causa de doença em muitas espécies de animais domésticos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

As bactérias que causam leptospirose pertencem ao gênero *Leptospira*, família Leptospiraceae e ordem Spirochaetales (FAINE, 1994). O gênero *Leptospira* foi primeiramente dividido em *L. biflexa* e *L. interrogans* por classificação fenotípica, sendo que *L. biflexa* reunia os sorovares saprófitos de vida livre, e *L. interrogans* os sorovares patogênicos (LEVETT, 2001).

Leptospiras são bactérias finas e altamente móveis, possuindo 0,15 μm de diâmetro e 10 a 20 μm de comprimento, apresentando extremidades em forma de gancho (Figura 2).

Possuem dois flagelos periplasmáticos que conferem movimentos de rotação e translação. Assim como as demais espiroquetas são Gram-negativas, e apresentam uma arquitetura de membrana dupla peculiar. A membrana citoplasmática encontra-se intimamente associada à camada de peptidoglicano, a qual é recoberta pela membrana externa. Fosfolipídeos, proteínas e LPS são os principais componentes da membrana externa (revisado em PICARDEAU, 2017).

Figura 2. Morfologia celular e arquitetura do envelope de *Leptospira* **A)** Representação esquemática de *Leptospira* indicando o movimento de rotação do endoflagelo e o tamanho celular. **B)** Crio-eletro tomografia de *Leptospira spp.* revelando estrutura tipo “tampa” e matriz quimiorreceptora que contém proteínas receptoras de metil (MCPs) perto do motor flagelar em cada extremidade polar **C)** Diagrama da parede celular, composta por membrana interna, fina camada de peptidoglicano e membrana externa com lipopolissacarídeos (LPS).

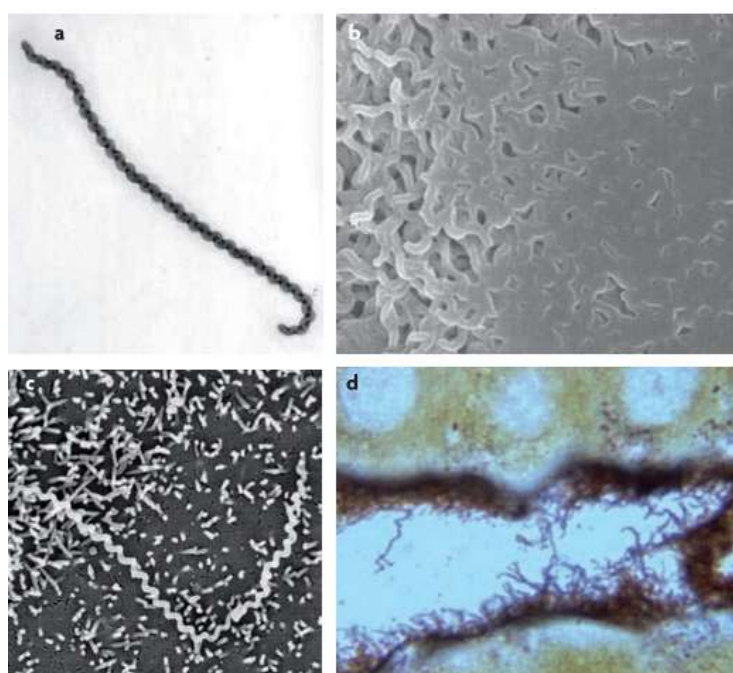


Fonte: adaptado de Picardeau, 2017

Estas espiroquetas são aeróbias, possuem temperatura ótima de cultivo de 30°C e crescimento considerado lento em comparação com outras espécies bacterianas conhecidas, com tempo de geração de 8 a 23 horas em condições controladas em laboratório (temperatura e disponibilidade de nutrientes). Porém, este tempo de geração

pode variar de acordo com a estirpe cultivada (LEVETT, 2001; VINCENT et al., 2019). As estirpes patogênicas podem sobreviver em solo contendo em torno de 20% de água, em água e solo com pHs variando entre 5,5 e 7,6 e temperaturas variando de 4 a 40°C. A habilidade de *Leptospira* sobreviver no ambiente também está relacionada a sua capacidade de resistir a mudanças de osmolaridade e de formar biofilme, tanto nas espécies patogênicas quanto saprófitas, como demonstrado na Figura 3 (RISTOW et al., 2008; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; BARRAGAN et al., 2017)

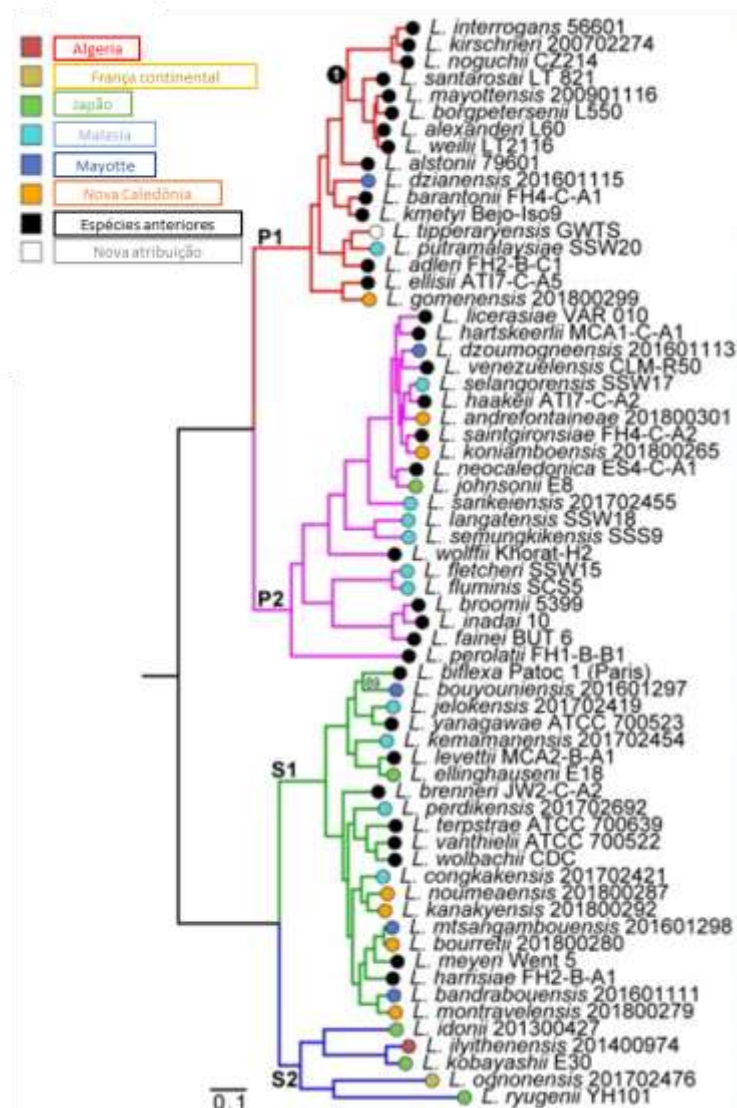
Figura 3. Leptospiras no ambiente e no hospedeiro. A) Microscopia eletrônica de *Leptospira* isolada. **B)** Biofilme de *Leptospira* em superfície de vidro. **C)** *Leptospira interrogans* aderida em célula Mardin-Darby polarizada (renal canina). **D)** Seção de tecido renal de *Rattus norvegicus*.



Fonte: adaptado de Ko, Goarant e Picardeau, 2009

Atualmente, as leptospiras são classificadas em mais de 300 sorovares com base na heterogeneidade estrutural dos carboidratos do LPS, presente na membrana da bactéria (BARRAGAN et al., 2011), agrupados em 64 espécies distintas, as quais são distribuídas em 4 grupos (Figura 4). Porém, é importante salientar que, segundo os últimos estudos, em um futuro próximo as técnicas sorológicas de identificação não mais serão utilizadas, devendo ser substituídas por técnicas moleculares de identificação como, por exemplo, a de NGS (*new generation sequence*) e MLST (*multi locus sequencing type*) (AHMED et al., 2006; VINCENT et al., 2019).

Figura 4. Árvore filogenética de *Leptospira* spp. O primeiro clado (ramos em vermelho e rosa), contendo os subclados P1 e P2, compreende as espécies patogênicas, responsáveis por infecção em humanos e/ou animais, e intermediárias, as quais não são ambientais, porém não tiveram seu status patogênico confirmado. O segundo clado (ramos verdes e azuis), contendo os subclados S1 e S2, engloba as espécies saprófitas, isoladas a partir do meio ambiente e que não são responsáveis por causar infecções.



Fonte: Adaptado de: Vincent et al., 2019

As características genéticas mais marcantes nas leptospiros são o conteúdo G-C entre 35 e 41% e a presença de dois cromossomos circulares, uma característica incomum em bactérias. O tamanho do cromossomo maior varia entre 3,6 e 4,3 Mb, dependendo da espécie, possuindo características típicas de cromossomos bacterianos, como genes de replicação de proteínas *dnaA*, *dnaN*, *gyrA* e *gyrB* assim como a maior parte dos genes essenciais para a sobrevivência da bactéria. Em contrapartida, o cromossomo menor possui entre 277 e 350 kb e contém uma origem de replicação, que é característica de plasmídeos bacterianos. Porém, por também possuir genes essenciais envolvidos na biossíntese de

aminoácidos essenciais é considerado um cromossomo, e não um plasmídeo típico (XUE; YAN; PICARDEAU, 2009).

1.2 Epidemiologia

As bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* são responsáveis por causar a doença leptospirose. Sua incidência está intimamente relacionada aos períodos de maior chuva, principalmente em regiões em desenvolvimento, onde não há saneamento básico, sendo endêmica em certas regiões tropicais e sub-tropicais. Para cidadãos que vivem em regiões desenvolvidas o maior risco de contaminação é atribuído a práticas esportivas em ambiente aquático e viagens para locais onde não há saneamento básico. Trabalhadores rurais, veterinários, tratadores de animais, indivíduos imunossuprimidos, pessoas que vivem ou trabalham em locais sujeitos a alagamentos são consideradas grupo de risco para esta doença. É ainda uma enfermidade de importância médica e econômica relevante, com incidência anual de cerca de 1 milhão de casos em humanos, sendo que destes em torno de 58 mil vêm a óbito, além de apresentar grande impacto econômico pela perda de animais de produção (revisado em MELO; PECONICK, 2019).

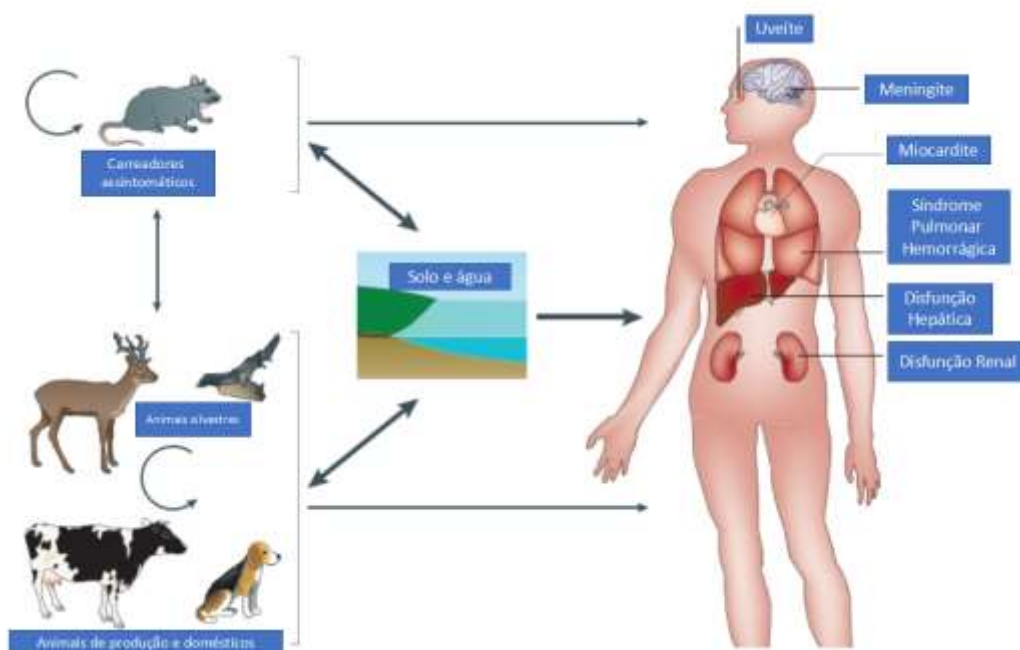
É importante salientar que além da perda econômica pelo acometimento de animais de produção, a doença também se faz presente em animais de vida livre. No trabalho apresentado por Vieira; Pinto; Lilenbaum, (2018), onde foi realizada uma grande revisão literária, salienta-se que animais de muitas espécies (incluindo mamíferos, répteis, aves e anfíbios) e diversos biomas ainda pouco estudados apresentam a doença e são reportados, porém sua prevalência não é significativa.

Devido à complexa e diversa interação entre animais (incluindo o homem) e o ambiente, o risco de exposição a fontes ambientais contaminadas é um desafio a ser controlado. A associação da leptospirose com chuvas e eventos naturais extremos é bem estabelecida, e estas condições poderiam favorecer a persistência e dispersão de leptospiras no ambiente de maneira que leve ao aumento das infecções humanas (BARRAGAN et al., 2017).

No período de 2007 a 2016 foi registrado no Brasil um total de 39.623 casos humanos confirmados de leptospirose, com média anual de 3.926 casos e taxa de letalidade

de 8,9%, sendo as regiões sudeste e sul as responsáveis pelo maior número de casos. Estes ocorreram com maior frequência no período de outubro a março, com exceção da região nordeste, que registrou a maior incidência no período entre abril e agosto. Em todas as regiões indivíduos do sexo masculino com idade entre 20 e 34 anos são os mais acometidos. Em 79,2% dos casos a infecção ocorreu em ambiente urbano, e as características do local de transmissão sugerem roedores e contato com lama ou enchente como principais fontes de transmissão (BRASIL, 2018). A transmissão da leptospirose requer circulação endozoonótica do patógeno entre os animais reservatórios, e os sorovares apresentam especificidade, mas não exclusividade, de infecção do hospedeiro. Espécies de mamíferos excretam leptospiros em sua urina e servem como reservatórios para sua transmissão. Os patógenos são mantidos em ambientes silvestres e domésticos por transmissão entre espécies de roedores, que são carreadores assintomáticos. As leptospiros podem então infectar rebanhos e animais domésticos e selvagens, e causar uma série de manifestações e estado de portador. A manutenção da leptospirose nessas populações deve-se à exposição contínua a reservatórios de roedores ou à transmissão em rebanhos de animais. A leptospirose é transmitida aos humanos por contato direto com animais reservatórios ou por exposição a água ou solo contaminados (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Na Figura 5 pode-se observar como se dá o ciclo de transmissão da doença.

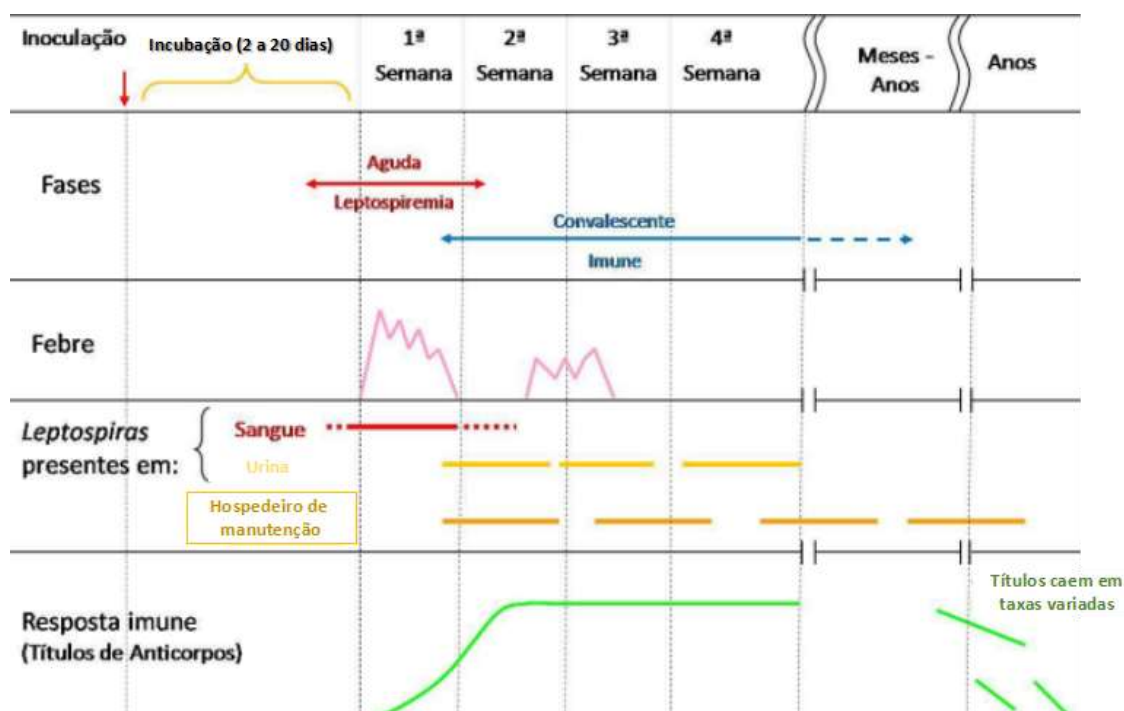
Figura 5. O ciclo da infecção por leptospiros.



Fonte: Adaptado de: Ko et al., 2009

A infecção em humanos pode causar uma doença bifásica, febril e aguda durante a fase inicial "leptospirêmica", progredindo para a fase "imune" com manifestações multissistêmicas graves, como disfunção hepática e icterícia, insuficiência renal aguda, síndrome de hemorragia pulmonar, miocardite e meningoencefalite. Embora a resposta imune elimine os patógenos, as leptospirosas podem persistir por períodos prolongados em locais imunoprivilegiados, como os túbulos renais e a câmara anterior e o humor vítreo do olho. Desta forma, podem ser secretadas na urina semanas após a resolução da doença ou causar uveíte meses após a exposição. Os seres humanos são hospedeiros acidentais e não liberam um número suficiente de leptospirosas para servir de reservatório para a transmissão (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; VERNEL-PAUILLAC; WERTS, 2018)

Figura 6. Natureza bifásica da leptospirose. A fase aguda (leptospiremia) ocorre na 1ª semana da doença e a partir da 2ª semana ocorre a fase convalescente (imune), onde há a produção de anticorpos. Episódios de febre acontecem principalmente na fase aguda, porém podem manifestar-se também durante a fase imune. As leptospirosas são encontradas no sangue durante a 1ª semana e após este período na urina. Os títulos de anticorpos aumentam durante as duas primeiras semanas, atingindo um platô, e começam a decair em taxas variadas após meses ou anos da infecção.



Fonte: Adaptado de: Levett, 2001

1.3 Patogênese

Após a entrada no hospedeiro via mucosas e/ou abrasões na pele leptospiros patogênicas atravessam a matriz extracelular (MEC) e chegam à circulação. Devido à grande capacidade de locomoção, rapidamente atingem os órgãos-alvo. Para aderir a componentes da matriz, expressam proteínas de superfície com afinidade por colágenos, fibronectina, laminina, proteoglicanas, entre outras (BARBOSA et al., 2006; ATZINGEN et al., 2008; LIN et al., 2009). Ainda, uma vez na circulação, possuem mecanismos para escapar à lise mediada pelo sistema complemento, primeira linha de defesa do sistema imune inato (BARBOSA; ISAAC, 2020).

A matriz extracelular é parte essencial de todos os tecidos e órgãos e fornece não apenas um arcabouço físico para os constituintes celulares, mas também inicia reações bioquímicas e biomecânicas cruciais que são necessárias para a morfogênese, diferenciação e homeostase do tecido, sendo composta basicamente por água, proteínas e polissacarídeos. Cada tecido possui uma constituição única de MEC, sendo os seus principais componentes as proteoglicanas e as proteínas fibrosas, como colágenos, elastina, fibronectina e laminina, que preenchem o espaço extracelular como um gel (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). Dentre as proteoglicanas cabe destacar as proteínas decorina e biglican. Estas proteínas fazem parte das *small leucine-rich repeat proteoglycans* (SLRPs), e podem afetar a taxa de crescimento, tamanho, morfologia e conteúdo dos feixes de fibrila, as quais são fibras colágenas do tecido conjuntivo (MOUW; OU; WEAVER, 2014).

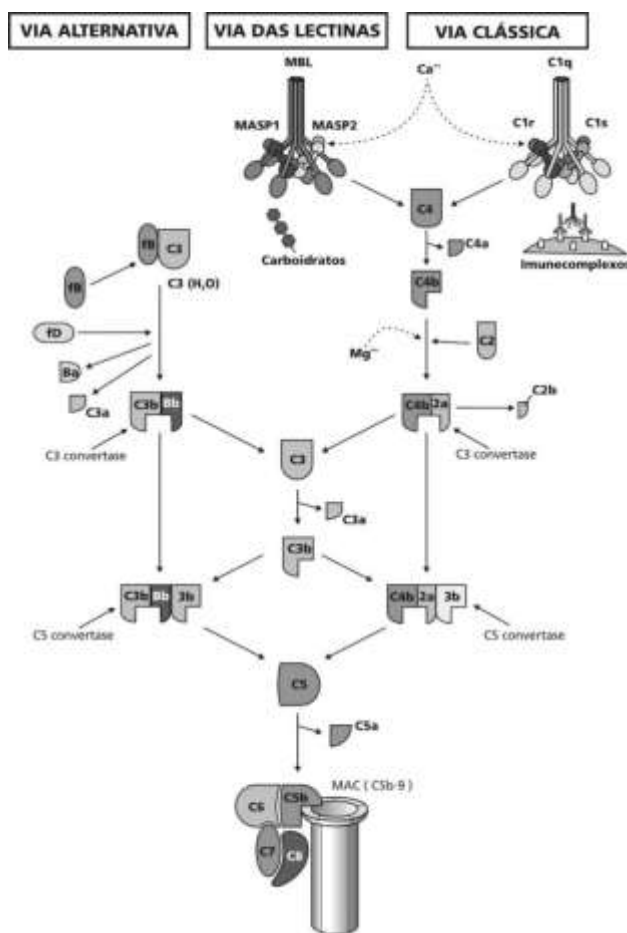
Já o sistema complemento, o qual é ativado em forma de cascata e possui mais de trinta proteínas em sua composição, está presente na circulação (proteínas solúveis) ou na superfície de certos tipos celulares. A ativação deste sistema se dá por três vias: clássica, das lectinas e alternativa. A ativação das vias alternativa e das lectinas não requer a participação de moléculas de anticorpo, e a via clássica necessita geralmente de moléculas de IgM ou IgG ligadas a antígenos específicos para ser ativada. Cabe ressaltar que a via alternativa é ativada continuamente em pouca intensidade; e somente na presença de um ativador exógeno, esta é amplificada. Sua regulação também é feita de forma contínua. (ISAAC; 2009)

A ativação do complemento pelas três vias culmina na clivagem da molécula C3 e subsequentemente na formação de C5 convertase, que cliva a molécula de C5 em C5b e

C5a. O C5b liga-se a C6, e C7 e C8 se juntam a este pré-complexo para formar o complexo C5b-8. A ligação de C9 forma o C5b-9 ou complexo de ataque à membrana (MAC) que, inserido na membrana das células-alvo, provoca a formação de “poros” que permitem um influxo descontrolado de água e íons, com turgência e lise celular subseqüentes. A molécula C4 do sistema complemento somente é clivada durante a ativação das vias clássica e das lectinas, de forma a compor a C3 convertase dessas duas vias (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

A figura abaixo resume a ativação da cascata pelas três vias que culmina em uma via comum, terminal, com a formação do MAC, o qual formará poros na membrana e causará a lise celular do patógeno em questão.

Figura 7. Vias de ativação e via terminal do sistema complemento.



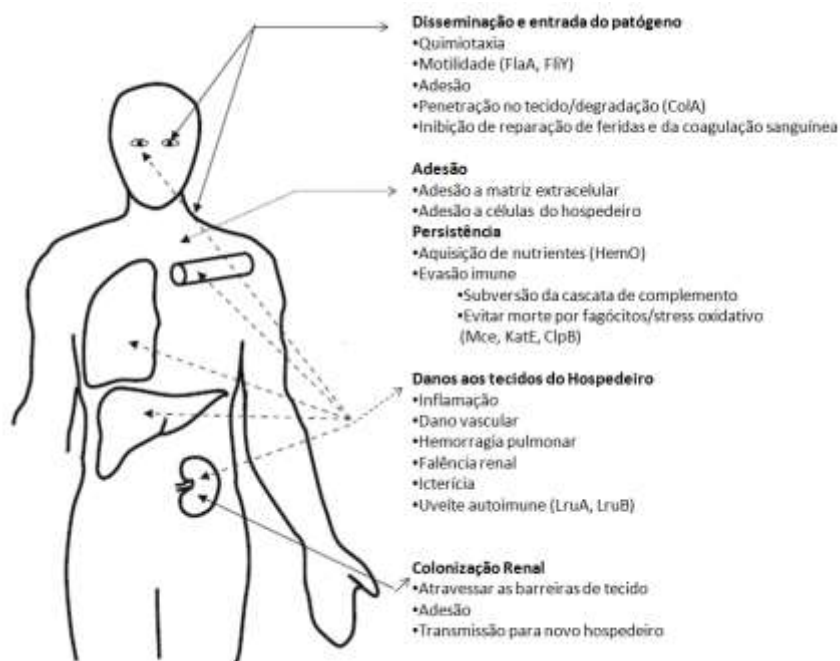
Fonte: <https://canal.cecierj.edu.br/recurso/8345>

Outro fator importante na patogênese de *Leptospira* está relacionado a distúrbios na cascata de coagulação. Sabe-se que proteases secretadas por estas espiroquetas

hidrolisam fibrinogênio, uma proteína essencial para a coagulação e homeostase (DA SILVA et al., 2018). Em consequência do dano vascular, a trombina cliva o fibrinogênio em fibrina insolúvel, desencadeando a formação da rede de fibrina, crucial para a homeostase. Durante a infecção, vários patógenos produzem proteinases que degradam o fibrinogênio e, como consequência, o reparo dos locais lesados é prejudicado. Inflamação, dano vascular e hemorragia pulmonar são manifestações clínicas típicas de pacientes com leptospirose grave (revisado em MURRAY, 2015). Portanto, estudos com o objetivo de investigar se essas patologias podem ser causadas por proteinases de *Leptospira* que degradam o fibrinogênio são relevantes.

Os mecanismos associados à patogênese da leptospirose são pouco conhecidos. Avanços recentes foram obtidos em consequência do desenvolvimento de ferramentas genéticas para se aprofundar o conhecimento das bases moleculares relacionadas à patogênese da doença. Com a obtenção de estirpes mutantes avaliadas em modelos animais, um pequeno número de fatores de virulência essenciais foi identificado, embora à maioria não tenha sido ainda atribuída função definida (MURRAY, 2015). Um resumo dos estágios da infecção aguda em humanos está ilustrado na Figura 8. Os fatores de virulência essenciais que levam à doença aguda e seu provável papel no desenvolvimento da doença estão indicados.

Figura 8. Estágios do processo de infecção por *Leptospira*. Os prováveis mecanismos de virulência estão indicados assim como os fatores de virulência experimentalmente confirmados, associados à doença.



Fonte: Adaptado de Murray, 2015.

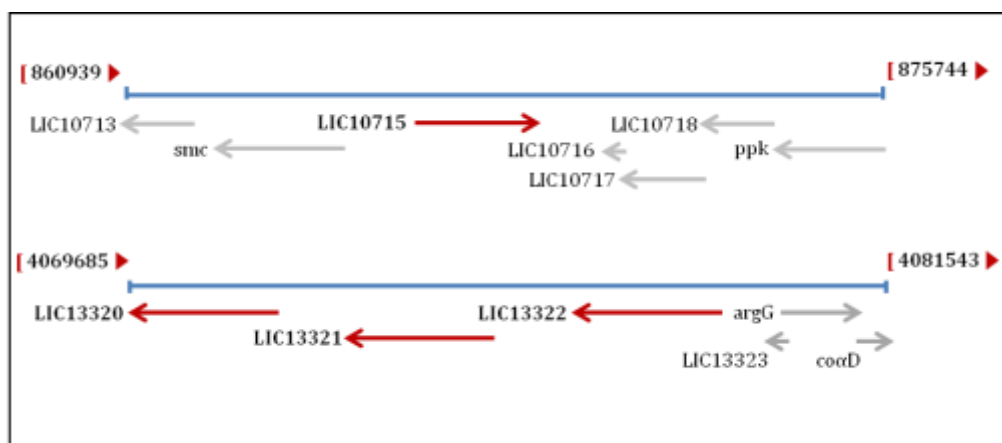
Conforme já mencionado, os casos graves de leptospirose caracterizam-se por falência renal aguda, vasculite, trombocitopenia, hemorragia pulmonar, miocardite, sufusão da conjuntiva e uveíte (LEVETT, 2001). *Leptospiras* produzem diversas proteases potencialmente capazes de produzir danos nos tecidos. Embora os mecanismos responsáveis por essas injúrias não sejam totalmente conhecidos, é certo que esfingomielinases, fosfolipases e metaloproteinases contribuem para a ruptura da integridade tecidual (MURRAY, 2015). Até então, pouco se conhece sobre a ação de proteínas secretadas por leptospiras patogênicas, mas é muito provável que tenham papel na virulência.

1.4 Proteases como fatores de virulência

A análise dos genomas de leptospiras disponíveis nos levou à identificação de uma classe de quatro termolisinas (Figura 9), codificadas pelos genes *LIC13320*, *LIC13321*, *LIC13322* e *LIC10715*, nos sorovares patogênicos *L. interrogans* Lai e Copenhageni e nas espécies *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. mayottensis*, *L. santarosai*, *L. weilli*, *L. alexanderi* e *L. alstonii* (PICARDEAU, 2017), apresentando alto grau de similaridade com

metaloproteinases da classe das termolisinas de *Enterococcus faecalis* e *Clostridium perfringens*, conhecidas por hidrolisar diversos substratos, incluindo colágenos, fibrinogênio, insulina e moléculas do sistema complemento (JIN et al., 1996; PARK et al., 2008).

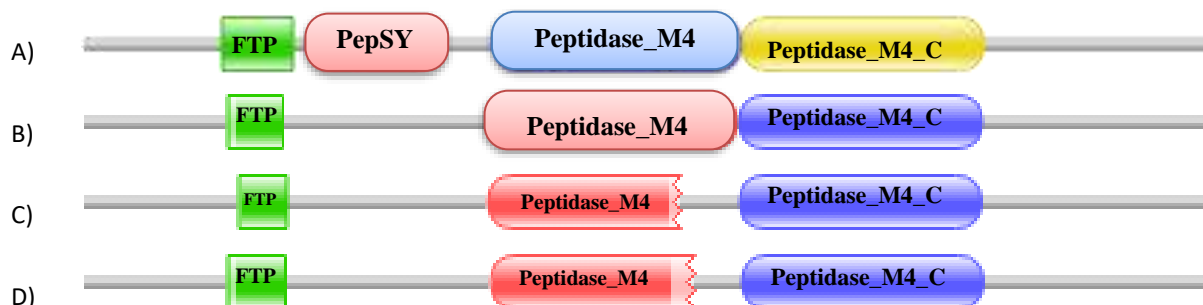
Figura 9. Localização dos genes que codificam as termolisinas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. No genoma deste sorovar há quatro genes que codificam proteínas da família das termolisinas (em vermelho). Três deles encontram-se em tandem (LIC13320, LIC13321 e LIC13322), e o quarto (LIC10715) localizado em outro local do genoma.



Fonte: adaptado de Nascimento et al., 2004.

As termolisinas de *Leptospira* possuem uma sequência sinal para secreção, os pró-domínios FTP (cuja função exata não é clara, mas é provável que iniba a peptidase, para impedir sua ativação prematura, ou tenha uma atividade de chaperona) e PepSY, presente apenas na LIC10715, sendo provável que esta região tenha uma função inibitória da protease, e os domínios catalíticos Peptidase_M4 (domínio catalítico em si, que possui o domínio HEXXH) e Peptidase_M4_C (domínio alfa-hélice na porção C terminal, o qual não possui o domínio catalítico HEXXH) (Figura 10). Muitas proteases bacterianas extracelulares são produzidas como pró-enzimas. A região anterior aos domínios catalíticos é chamada de pró-peptídeo, sendo constituída pelos domínios FTP e PepSY na termolisina codificada pela LIC10715. Os domínios catalíticos desta protease pertencem à família M4 das metaloproteinases, as quais requerem um cátion divalente, geralmente o zinco, para a catálise (fonte PFAM - acesso em 16/04/2020).

Figura 10. Representação esquemática dos domínios das termolisinas. **A)** termolisina codificada pelo gene LIC10715; **B)** termolisina codificada pelo gene LIC13320; **C)** termolisina codificada pelo gene LIC13321; **D)** termolisina codificada pelo gene LIC13322 (nprT). Pró-domínios: FTP e PepSY e domínios catalíticos: Peptidase_M4 e Peptidase_M4_C.



Fonte: Pfam database

Análises computacionais e ensaios de Western Blot com sobrenadante de cultura de diversos sorovares patogênicos realizados por nosso grupo indicam que pelo menos uma das termolisinas de *Leptospira*, a codificada pela *LIC13322*, é secretada para o meio extracelular. Essa protease foi produzida na forma recombinante em *E. coli* e apresentou atividade proteolítica sobre os componentes C3 e C6 do sistema complemento (FRAGA et al., 2014a; AMAMURA et al., 2017).

A existência de quatro genes que codificam termolisinas no genoma de leptospiros patogênicas suscita questionamentos. Quais seriam suas funções? Desempenhariam papéis aditivos ou redundantes? Todas seriam igualmente funcionais? Quais seriam suas especificidades no que diz respeito aos substratos? Diante dessas questões o presente projeto visa aprofundar o conhecimento sobre o tema com a finalidade de caracterizar essa família de metaloproteínas secretadas por leptospiros. Desta forma pretende-se avaliar a atividade proteolítica das quatro termolisinas sobre proteínas do sistema complemento humano, da matriz extracelular e da cascata de coagulação.

2. OBJETIVOS

Este projeto teve por objetivo avaliar a função das termolisinas codificadas pelos genes *LIC13320*, *LIC13321*, *LIC13322* e *LIC10715* no que diz respeito à evasão ao sistema complemento humano e à invasão tecidual.

As etapas experimentais consistiram na:

- Obtenção das proteínas heterólogas em *Escherichia coli* (termolisinas codificadas pelos genes *LIC13320*, *LIC13321*, *LIC13322* e *LIC10715*);
- Caracterização funcional destas proteínas (capacidade de hidrolisar substratos como proteínas da matriz extracelular, cascata de coagulação e moléculas do sistema complemento);
- Introdução do gene *LIC13322* na espécie não patogênica (*L. biflexa*);
- Realização de testes funcionais com a *L. biflexa/LIC13322* na presença de soro humano para avaliar se esta adquiriu a capacidade de resistir à atividade bactericida do soro, mediada pela via alternativa do sistema complemento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estirpes bacterianas e condições de cultivo

As estirpes *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni (patogênica) e *Leptospira biflexa* sorovar Patoc (não patogênica) foram fornecidas pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As bactérias foram cultivadas a 29°C sob condições aeróbias em meio líquido EMJH enriquecido com albumina sérica bovina (BSA, Difco). A estirpe transconjugante *Leptospira biflexa* sorovar Patoc / LIC13322, obtida no laboratório do Dr. Elsie Wunder, Universidade de Yale, EUA, nos foi enviada e aqui mantida em cultivo da mesma forma que as estirpes selvagens.

As cepas de *Escherichia coli* DH5 α e BL21-SI foram utilizadas para obtenção das proteínas recombinantes e foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) a 37°C e meio 2YT-ON a 30°C respectivamente.

3.2 Análises *in silico*

As análises *in silico* para seleção de iniciadores, predição de sequência e estrutura das proteínas, alinhamentos e obtenção de informações sobre os domínios pertencentes à classe de proteína estudada foram realizadas por ferramentas *on-line* disponíveis nos seguintes endereços:

- ◆ <https://web.expasy.org/protparam/> - predição de sequência de aminoácidos de acordo com a sequência de nucleotídeos;
- ◆ <https://www.uniprot.org/> - análise de sequência de aminoácidos;
- ◆ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - análise de sequência de nucleotídeos;
- ◆ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> - análise de sequência de nucleotídeos;
- ◆ <https://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> – predição de estrutura proteica.

As análises de sequência nucleotídica obtidas por sequenciamento e seleção de iniciadores para PCR foram realizadas pelo software SnapGene 4.0 e as análises da predição de estrutura proteica pelo software Chimera 1.12.

3.3 Amplificação dos genes *LIC10715*, *LIC13320* e *LIC13321*

Os iniciadores utilizados para as amplificações dos genes *LIC10715*, *LIC13320* e *LIC13321* estão descritos na Tabela 1. O gene *LIC13322* já havia sido amplificado em um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa. Os iniciadores foram desenhados de modo que todos os genes fossem amplificados na mesma região, contendo o domínio PepSY (supostamente importante para o correto enovelamento das proteínas e comprovadamente presente na *LIC10715*) e os domínios M4 e M4_C (Figura 10). Em todos os iniciadores foram adicionadas caudas com sítios para enzimas de restrição para realização de subclonagem no vetor de expressão pAE após a clonagem no vetor pGem-T easy (Promega).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificar os genes *LIC10715*, *LIC13320* e *LIC13321* para posterior clonagem em vetor *pGEM-T Easy*

Iniciador	Sequência (5'-3')	Enzima de restrição	Tamanho do fragmento amplificado
<i>LIC10715</i>			
10715FullR	<u>CCATGG</u> GCTAAACAATAAATGGGCGAATC	NcoI	1995pb
10715PepF	CTCGAGTTTTCTGGGATCGAACAAG	XhoI	
<i>LIC13320</i>			
13320FullR	<u>CCATGG</u> GCTATGTATAGTCCTCCACTTCC	NcoI	1923pb
13320PepF	CTCGAGTCAGAATCAGAAGCGTTT	XhoI	
<i>LIC13321</i>			
13321FullR	<u>CCATGG</u> GCTAAATATAATCCTCCTTCTCC	NcoI	1938pb
13321PepF	CTCGAGAATTCCTCCTAAGCTATCC	XhoI	

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), 3 mM de MgCl₂, 5 µL do tampão de reação de PCR 10x, 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen), 100 ng de DNA genômico de *Leptospira interrogans* sorovar Copanheni, 10 pmol de cada primer (FullR e PepF) e água milliQ estéril para um volume final de 50 µL. Os ciclos de amplificação empregados para todos os

genes foram: 95°C por 5 minutos (1 vez), 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos (35 vezes) e 72 °C por 7 minutos (1 vez). Após os ciclos de amplificação as reações foram acondicionadas a 4 °C para posteriormente serem analisadas por eletroforese em gel de agarose.

3.4 Eletroforese em gel de agarose

Os géis de agarose foram preparados fundindo-se agarose (Invitrogen) em tampão TAE 1x na concentração final de 1%, e então corados com solução GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, Hayward, CA, EUA) na concentração de 1:5000.

Os produtos amplificados das PCRs foram acrescidos de tampão de corrida 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%). Como marcador de peso molecular foi utilizado o 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen), conforme indicado. Após a corrida eletroforética, realizada sob corrente elétrica de 70 V em tampão TAE 1x, os géis foram observados em transiluminador de luz ultravioleta UVP (Upland, San Leandro, CA, EUA) e as imagens adquiridas pelo equipamento UVITEC com o *software* Alliance HD 6 v16.15 (Cambridge, Inglaterra, Reino Unido).

3.5 Clonagem dos genes *LIC10715*, *LIC13320* e *LIC13321* e obtenção de mutantes no sítio catalítico (HEXXH)

Os produtos de PCR dos genes de interesse foram purificados com o kit GeneClean TurboKit® (MP Biomedicals) e posteriormente clonados em vetor de clonagem pGEMT-Easy (Promega). Para proceder à ligação dos insertos ao vetor, os genes foram submetidos à adenilação sob as seguintes condições: 2mM dATP, 4µL tampão 10x, 1U taq DNA polimerase (Invitrogen), 1mM MgCl₂, 29,4µL dos produtos de PCR purificados. As reações foram incubadas a 72°C por 20 minutos e inativadas por congelamento. A concentração dos fragmentos foi estimada em gel de agarose utilizando-se o Low DNA Mass Ladder (Thermo Fisher Scientific). A reação de ligação dos fragmentos ao vetor pGem-T Easy (Promega) foi realizada de acordo com as especificações do fabricante.

Em seguida, procedeu-se à transformação em células quimio-competentes por choque térmico. Células competentes DH5α foram retiradas do freezer a -80°C e mantidas em gelo por 10 minutos. Após este período 10µl dos produtos de ligação foram adicionados

a 50µl de células competentes, e realizou-se nova incubação em gelo por mais 30 minutos. O produto da incubação foi submetido a choque térmico de 42°C por 2 minutos, seguido de imediata incubação em gelo por 10 minutos. Em seguida, 350µl de meio SOC previamente aquecido a 37°C foram adicionados às células e as mesmas foram incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação a 220 rpm. Após recuperação as células foram plaqueadas em meio de cultivo LB acrescido de ampicilina a 100µg/mL, IPTG 0,1M e X-gal a 20mg/mL e mantidas a 37°C por 16-18 horas. Colônias brancas foram selecionadas para confirmação de clonagem por PCR e extração dos plasmídeos com o kit Qiaprep spin mini prep kit (Qiagen), seguida de digestão com as enzimas de restrição XhoI e NcoI (New England Biolabs) para confirmação da presença dos insertos. Os clones positivos foram sequenciados e os insertos desprovidos de alterações foram clonados no vetor de expressão pAE (Ramos et al., 2004) previamente digerido com as enzimas de restrição acima mencionadas. Os produtos de ligação em plasmídeo pAE foram usados para transformação de células DH5α quimio-competentes, as quais foram submetidas à transformação de acordo com o protocolo acima mencionado. Após recuperação as células foram plaqueadas em meio LB acrescido de ampicilina e incubadas a 37°C por 16-18 horas. Colônias isoladas foram selecionadas para extração de plasmídeos e confirmação da presença dos insertos, conforme já mencionado.

Plasmídeos (pUC57) com a sequência do gene *LIC13322* contendo três diferentes mutações alterando aminoácidos importantes dentro do sítio catalítico HEXXH (AEXXH, HAXXH e HEXXA) foram adquiridos comercialmente (GeneScript, Hong Kong, China). Estes plasmídeos foram digeridos, os insertos purificados e subclonados no vetor de expressão pAE conforme acima descrito.

3.6 Sequenciamento dos genes clonados no vetor pAE

Após clonagem em vetor de expressão foi realizado o sequenciamento dos plasmídeos contendo os genes de interesse, a fim de se descartar clones com eventuais mutações. Para o sequenciamento foi utilizado um total de 100ng dos plasmídeos purificados, obtidos utilizando kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, e 1,6 pmol de cada iniciador.

O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático *Applied Biosystems* 3500 de acordo com as especificações do fabricante com o *Bigdye® terminator v3.1 cycle sequencing kit*.

Os resultados dos sequenciamentos foram analisados utilizando o software de uso livre *SnapGene viewer* e as sequências obtidas após alinhamento foram analisadas pela plataforma online BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3.7 Expressão e purificação das proteínas recombinantes LIC10715, LIC13320, LIC13321 e mutantes da LIC13322 no sítio catalítico HEXXH

Para expressar as proteínas recombinantes, a cepa *E. coli* BL21-SI quimio-competente foi transformada com as construções obtidas no vetor pAE. Colônias isoladas foram inoculadas em meio 2YT-ON suplementado com ampicilina e a expressão induzida com NaCl 0,3M. Para tal, os clones selecionados foram cultivados em 500 mL de meio 2YT - ON sob agitação de 250 rpm a 30°C até atingirem a densidade ótica (D.O.) de 600 nm. Adicionou-se então, o indutor (NaCl) e incubou-se por 3 h a 150 rpm. As amostras foram centrifugadas e acondicionadas a -20°C. A confirmação da indução da expressão foi realizada por SDS-PAGE.

As proteínas foram expressas na forma insolúvel e antes da etapa de solubilização e renaturação, os corpúsculos de inclusão foram submetidos a lavagens. As bactérias (500 mL) foram centrifugadas (5.000 rpm por 10 minutos a 4°C) e ressuspensas em 100 mL do tampão A1 (5mM EDTA, 0,1M tris HCl em pH 7,5). Foi então adicionada lisozima na concentração de 50 µg/mL seguido de incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. As bactérias em suspensão foram então lisadas em sonificador na presença de 0,1% de deoxicolato de sódio para serem, então, centrifugadas novamente (8.500 rpm por 10 minutos a 4°C). Após centrifugação as bactérias foram novamente ressuspensas, agora em tampão A2 (EDTA 5 mM, Tris HCl 0,1M e deoxicolato de sódio 0,1% em pH 7,5), e então foram novamente submetidas a sonicação e centrifugação, sendo que este processo foi realizado 2 vezes. Após a segunda centrifugação os corpúsculos foram lavados com tampão Tris 50 mM e EDTA 1 mM pH 7,5 por 2 vezes e depois foram ressuspensos no mesmo tampão. As amostras foram então colocadas em sacos plásticos, seladas e submetidas a elevadas pressões hidrostáticas (2,4 kbar) em equipamento de pressurização R4-6-40, por 90 min. Seguiu-se descompressão a 0,4 kbar por 16 h e uma descompressão final até atingir a pressão atmosférica. As amostras foram centrifugadas a 12.000 × g por 15 min. Após a renaturação foi realizada diálise em tampão NaH₂PO₄ 25 mM pH 8,0. O sobrenadante contendo as proteínas renoveladas foi aplicado em coluna de exclusão molecular para a

obtenção das proteínas purificadas, em tampão NaH_2PO_4 25 mM pH 8,0 (CHURA-CHAMBI et al., 2018).

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As eletroforeses foram realizadas seguindo o protocolo descrito por SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. F. ; MANIATIS, (1989) sob amperagem fixa de 25 mA por gel. As amostras foram separadas em géis de poliacrilamida 10% após desnaturação a 96° C por 3 min. Como padrão de massa molecular foi utilizado o marcador Kaleidoscope (Bio-Rad). Após a eletroforese, os géis foram corados por Coomassie blue e/ou por prata, metodologia na qual o gel é incubado sequencialmente em uma série de soluções descritas na Tabela 2:

Tabela 2. Protocolo de coloração por prata de géis de poliacrilamida. Entre cada um dos passos foi descartada a solução antes de ser colocada a próxima. As soluções estão descritas no Anexo A

Coloração rápida por prata

<i>Passo 1</i>	50 mL de solução fixadora + aquecimento em microondas por 30 segundos seguido de agitação em temperatura ambiente por 5 minutos
<i>Passo 2</i>	50mL de etanol 30% + aquecimento em microondas por 30 segundos seguido de agitação em temperatura ambiente por 5 minutos
<i>Passo 3</i>	50mL de solução tiosulfato de sódio + aquecimento em microondas por 30 segundos seguido de agitação em temperatura ambiente por 2 minutos
<i>Passo 4</i>	50mL de água destilada + aquecimento em microondas por 30 segundos seguido de agitação em temperatura ambiente por 2 minutos
<i>Passo 5</i>	50mL de água destilada + aquecimento em microondas por 30 segundos seguido de agitação em temperatura ambiente por 2 minutos
<i>Passo 6</i>	50mL de solução corante + aquecimento em microondas por 30 segundos seguido de agitação em temperatura ambiente por 5 minutos
<i>Passo 7</i>	50mL de água destilada por 1 minuto sob agitação
<i>Passo 8</i>	50mL de solução reveladora e observação da coloração a temperatura ambiente
<i>Passo 9</i>	50mL da solução STOP

3.9 Análise da atividade proteolítica das proteínas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre proteínas do sistema complemento, da matriz extracelular e do plasma

A atividade proteolítica das quatro termolisinas sobre diversas moléculas do hospedeiro foi avaliada incubando-se essas proteases com cada uma das moléculas purificadas na presença de tampão PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM e KH₂PO₄: 1,8 mM).

Primeiramente 2 µg de cada uma das termolisinas foram incubados com 0,5 µg das moléculas do sistema complemento C3, C3b, C4, C4b, C5, C6, C7, C8 e C9 (*Complement Technologies Inc*, Texas, EUA) e as moléculas decorina, biglicam e fibrinogênio (*R&D systems*, Minneapolis, EUA) em um volume total de 50 µL. Todas as incubações foram feitas a 37°C pelos períodos de 0, 2, 4, 8 e 24 horas. Tendo as termolisinas apresentado atividade contra qualquer um dos componentes, curvas dose-resposta foram realizadas. Nestes casos, diferentes quantidades da proteína (0,5 µg, 1 µg e 2 µg) foram incubadas com o substrato por 24 horas. A atividade proteolítica foi inibida com o inibidor de metaloproteases 1-10 fenantrolina (5 mM). A LIC13322 contendo alterações em seu sítio catalítico, mutantes AEXXH e HAXXH, foi incluída como controle.

Os produtos de degradação foram analisados por Western blot utilizando-se anticorpos específicos, conforme descrito nas legendas. Somente a degradação do fibrinogênio foi analisada em gel de poliacrilamida corado com prata.

3.10 Expressão heteróloga da termolisina LIC13322 em *L. biflexa*

O processo de clonagem do gene *LIC13322* no vetor pMAoRI e posterior conjugação na estirpe saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc foi realizada em colaboração com o Dr. Elsie Wunder da Universidade de Yale.

O gene *LIC13322* foi amplificado através de uma *nested* PCR usando os iniciadores 13322a1IF (5' TCCTTTTGACCTATATCCGCAGTAAAAGCG 3') e 13322a1IR (5' ACAGACGCATGATTAATAATATATTAGA 3'), que produziram um fragmento de 4,38 kb usando o DNA genômico de *L. interrogans* serovar Copenhageni L1-130 (temperatura de anelamento 48 ° C). Para amplificar *LIC13322* a partir da reação de amplificação anterior, foram utilizados os iniciadores 13322_fsma (5' TCCCCGGGCAGAATTTATGATACTTCATCGTATC 3') e 13322R (5'

GGAATTCTAGAGATTTCTAAATACTGA 3'), os quais produziram um produto de interesse de 3 kb juntamente com amplificações não específicas (temperatura de anelamento de 48 ° C). Para eliminar estes fragmentos não específicos, foi realizada uma PCR de gradiente de 49 ° C a 52 ° C. A banda de interesse foi excisada, purificada e digerida sequencialmente, primeiro com SmaI a 25 ° C (tampão Cutsmart, NEB) por 3 horas, e depois com EcoRI-HF a 37 ° C (tampão Cutsmart, NEB) por mais 3 horas. O plasmídeo pMaORI também foi digerido duas vezes com as mesmas enzimas. O produto de amplificação de 3 kb e o plasmídeo pMaORI duplamente digerido foram submetidos a ligação usando T4 DNA Ligase (NEB) a 16 ° C por 20 h. O produto de ligação foi usado para transformação em células competentes de *E. coli* β 2163. O produto foi plaqueado em meio LB com espectinomicina (LB + Spec) e mantido a 37 ° C durante 20 h. Os transformantes foram selecionados, inoculados em 200 μ L de LB + Spec e deixados crescer por 3 h a 37 ° C antes de serem usados como molde para a PCR. O transformante positivo foi então conjugado com *L. biflexa* sorovar Patoc e plaqueado em meio sólido EMJH com espectinomicina (EMJH + Spec). Os transconjugantes obtidos na incubação a 29 ° C após 3 - 4 semanas foram inoculados em 2 mL de EMJH + Spec e deixados crescer por 6 dias a 29 ° C antes da confirmação por PCR. As três culturas positivas de transconjugantes foram criopreservadas a -80 ° C e enviadas para nosso laboratório. Alíquotas dessas culturas foram congeladas a -80°C e -196°C utilizando DMSO 5% como crioprotetor e, quando necessário, descongeladas e utilizadas nos ensaios funcionais previstos.

3.11 Análise de sobrevivência da *L. biflexa*/LIC13322 em soro humano normal

A atividade bactericida do soro humano normal (*Complement Technologies Inc*) sobre a *L. biflexa*/LIC13322 foi avaliada utilizando o teste de redução da resazurina. O Alamar Blue® (resazurina) é um corante azul e não fluorescente. Porém, quando adicionado em um meio contendo células viáveis este é reduzido, provavelmente por uma reação de consumo de oxigênio, tornando-se um corante fluorescente rosa (O'BRIEN et al., 2000).

Neste ensaio 1×10^7 bactérias (estirpes LPF, Patoc e transconjugantes 1B, 2B e 3B) foram incubadas por 30 minutos a 37°C com 25% de soro humano ativo e inativo (incubado por 30 minutos a 56°C). Após este período adicionou-se resazurina na concentração de 20%. A reação foi mantida em estufa a 37°C por 16 horas, protegida da luz. A leitura da

absorbância foi realizada nos comprimentos de onda de 550 e 595 nm. A porcentagem de sobrevivência foi calculada utilizando a fórmula do Quadro 1.

Quadro 1. Cálculo de sobrevivência das leptospiras utilizando a resazurina

Amostra	Abs 550 nm	Abs 595 nm
200 µL de meio com 20% resazurina	A	X
200 µL de meio	B	Y
Total	(AO _{LW}) A - B	(AO _{HW}) X - Y
<p>Fator de correção (RO) = AO_{LW}/AO_{HW}</p> <p>% Células vivas = $\frac{A_{LW} - (A_{HW} \times R_O) \text{ do poço teste}}{A_{LW} - (A_{HW} \times R_O) \text{ do controle de crescimento}} \times 100$</p> <p>% Inibição = 100% - % células vivas</p>		

4. RESULTADOS

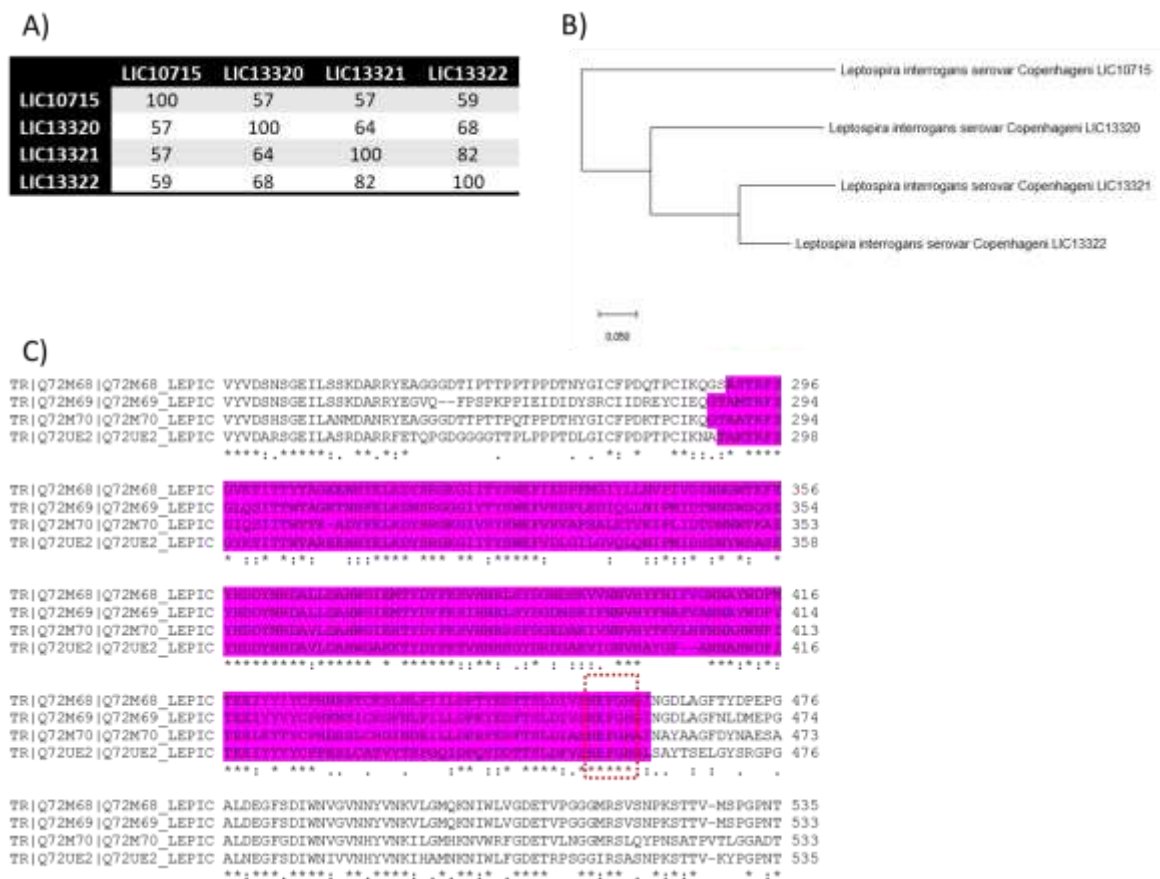
4.1 Análises in silico

De forma a comparar estas termolisinas com outras previamente descritas presentes em outras bactérias, conhecidas por degradar substratos do hospedeiro como moléculas do plasma e da matriz extracelular, e assim facilitar a invasão e sobrevivência desses patógenos no organismo, foi realizado o alinhamento de sequência de aminoácidos das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 entre si e com termolisinas e proteínas pertencentes à família M4.

O grau de identidade e similaridade entre as quatro termolisinas de *Leptospira* mencionadas varia de 57 a 82% e 69 a 89% respectivamente (Figura 10a). As proteínas LIC10321 e LIC10322 apresentam maior grau de identidade entre si. Como esperado, a LIC10715, cujo gene localiza-se em outro local do genoma, é a mais divergente em relação às demais proteases (Figura 11a, 11b). A análise do alinhamento múltiplo revela um bom grau de conservação dos aminoácidos que flanqueiam o sítio ativo do domínio catalítico M4, sugerindo possíveis preferências pelos mesmos substratos (Figura 11c).

As termolisinas de outras bactérias são conhecidas por degradar substratos do hospedeiro como moléculas do plasma e da matriz extracelular, facilitando a invasão e sobrevivência desses patógenos no organismo. Termolisinas ou “termolisinas-like” de *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus anthracis* diferem substancialmente nos resíduos de aminoácidos próximos ao sítio ativo HEXXH, que provavelmente compõem o “*binding pocket*” dos substratos. No entanto, todas são capazes de hidrolisar colágenos e fibronectina (JIN et al., 1996; CHUNG et al., 2006). Há também substratos específicos de cada uma delas. Portanto, os padrões de sequência nem sempre predizem a especificidade pelo substrato.

Figura 11. Análises in silico (a) Matriz de identidade de sequência das quatro termolisinas utilizadas neste estudo. **(b)** Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento de sequência de aminoácidos das metaloproteinases de *L. interrogans* e demais espécies que possuem termolisinas já caracterizadas. A história evolutiva foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança baseado no modelo baseado na matriz JTT (Jones et al., 1992). A árvore com a maior probabilidade de log (-5358,02) é mostrada. A árvore inicial para a pesquisa heurística foi obtida automaticamente aplicando algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pares estimadas usando um modelo JTT, e então selecionando a topologia com valor superior de log verossimilhança. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidas no número de substituições por site. A análise envolveu 8 sequências de aminoácidos. Houve um total de 812 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA X (Kumar et al., 2018). **(c)** Alinhamento das quatro termolisinas feito no Uniprot utilizando o Clustal O. Estão representados apenas os domínios catalíticos (realçados em rosa) com as regiões que os flanqueiam. O sítio catalítico HEXXH está dentro da caixa vermelha. Q72M68: LIC13322, Q72M69: LIC13321, Q72M70: LIC13320, Q72UE2: LIC10715.



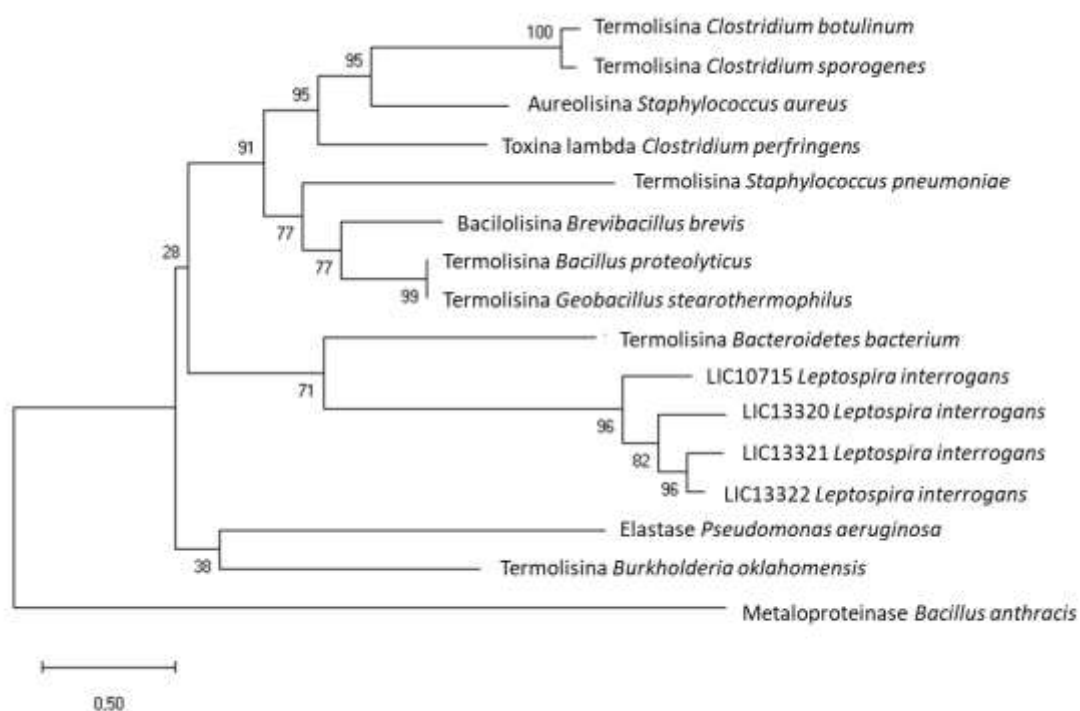
Após alinhamento de aminoácidos realizou-se a montagem da árvore filogenética. Para esta árvore foram escolhidas proteínas pertencentes à família M4 de diversas bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas (Figura 12).

Como é possível observar há, pelo menos, um grupo próximo a *Leptospira* que foi validado pelo bootstrap (*Bacteroidetes*) e também há grandes ramos que separam *Leptospira* de outros grupos que possuem bootstraps baixos (28 e 38), mostrando que há uma grande politomia, ou seja, as relações filogenéticas ou não foram bem resolvidas pelo

seu conjunto de dados ou que, de fato, houve separações múltiplas de subtipos evolutivos independentes naquele ponto. É possível também observarmos que a metaloproteinase de *Bacillus anthracis*, não se insere no ramo de demais *Bacillus*.

Embora esta análise não seja o principal objetivo do trabalho, as informações geradas pela construção dessa árvore permitem que façamos ilações sobre o comportamento bioquímico da M4 de *Leptospira*: será que compartilha preferências por substratos com grupos próximos e diverge dos grupos distantes em relação a essas preferências?

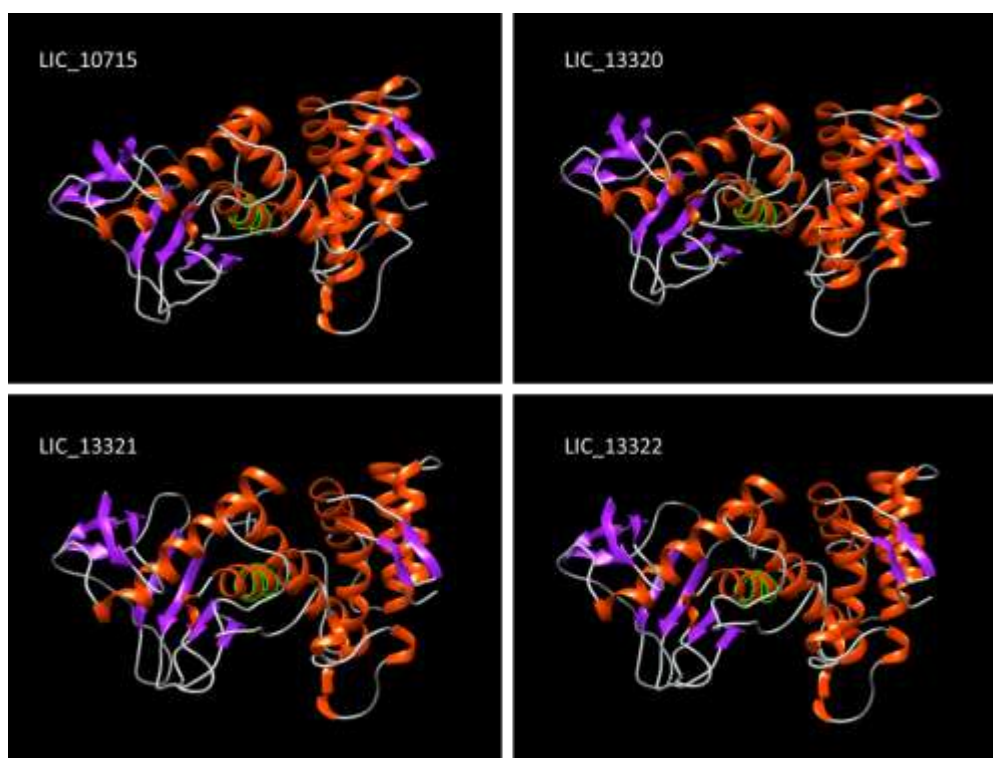
Figura 12. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento de sequência de aminoácidos das metaloproteinases de *L. interrogans* e demais espécies. A história evolutiva foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança baseado no modelo baseado na matriz JTT (Jones et al., 1992). A árvore com a maior probabilidade de log (-20965.33) é mostrada. A árvore inicial para a pesquisa heurística foi obtida automaticamente aplicando algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pares estimadas usando um modelo JTT, e então selecionando a topologia com valor superior de log verossimilhança. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidas no número de substituições por site. A análise envolveu 16 sequências de aminoácidos. Houve um total de 1311 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram feitas com MEGA X (Kumar et al., 2018).



Além da análise comparativa das sequências de aminoácidos das quatro termolisinas aqui estudadas foi realizada a predição da estrutura terciária das quatro termolisinas de *Leptospira* para comparação de suas conformações (Figura 13). Conforme esperado, as quatro proteínas possuem estrutura similar. Os membros da família M4 de peptidases para

os quais a estrutura tridimensional foi resolvida mostraram dois domínios principais. O domínio N-terminal contém principalmente estruturas β -barril, enquanto o domínio C-terminal contém predominantemente estruturas α -hélice. O sítio ativo está localizado em uma fenda entre estes dois domínios (DE KREIJ; VENEMA; VAN DEN BURG, 2000) e isto se mantém na estrutura observada nas quatro termolisinas de *L. interrogans*.

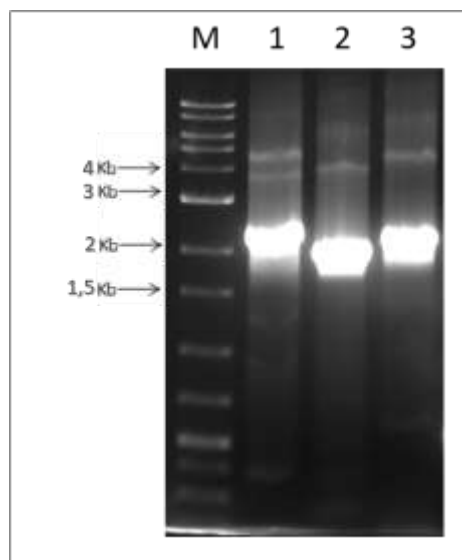
Figura 13. Predição da estrutura terciária das quatro termolisinas de *L. interrogans*. Destacado em verde podemos observar a localização espacial do domínio HEXXH, presente na mesma região em todas as proteínas, em roxo as estruturas de α -hélice e em laranja as estruturas β -barril. A determinação da estrutura terciária foi realizada utilizando a ferramenta Phyre-2 e a análise estrutural feita pelo software Chimera 1.2



4.2 Produção das proteínas recombinantes LIC10715, LIC13320 E LIC13321 e mutantes no sítio catalítico HEXXH

Os genes *LIC10715*, *LIC13320* e *LIC13321* foram devidamente amplificados por PCR (Figura 14). Os fragmentos obtidos a partir da reação foram adenilados, purificados e clonados primeiramente no vetor pGEM-T easy, conforme mencionado no item Materiais e Métodos. O gene *LIC13322* já havia sido clonado e a proteína produzida anteriormente pelo grupo.

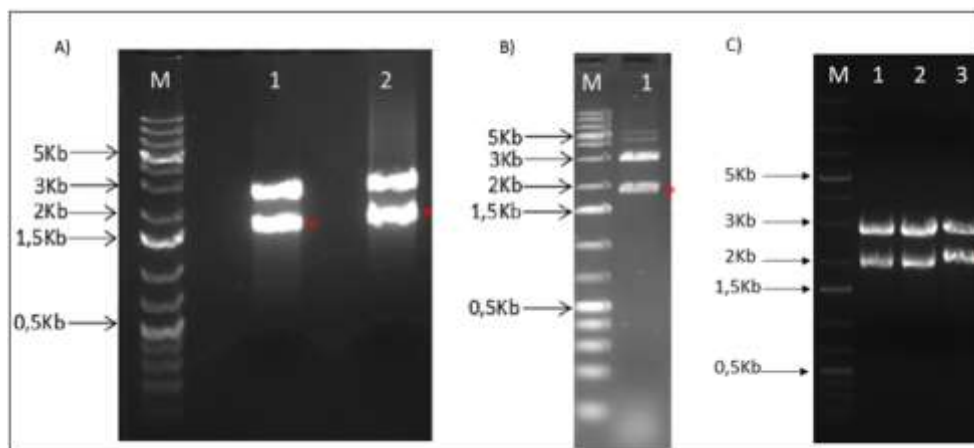
Figura 14. Amplificação dos genes LIC10715 (1), LIC13320 (2), LIC13321 (3) por PCR- Os fragmentos de 2064, 1908 e 2025 pb são visualizados no gel de agarose 1% corado com Gel Red® (Invitrogen).



Após a transformação, foi realizada a extração dos plasmídeos que foram então digeridos com as enzimas XhoI e NcoI para liberação dos insertos. Na Figura 14 observam-se os produtos de digestão em que se visualizam bandas de aproximadamente 3 kb correspondentes ao vetor de clonagem linearizado e bandas com cerca de 2 kb, correspondentes aos insertos liberados.

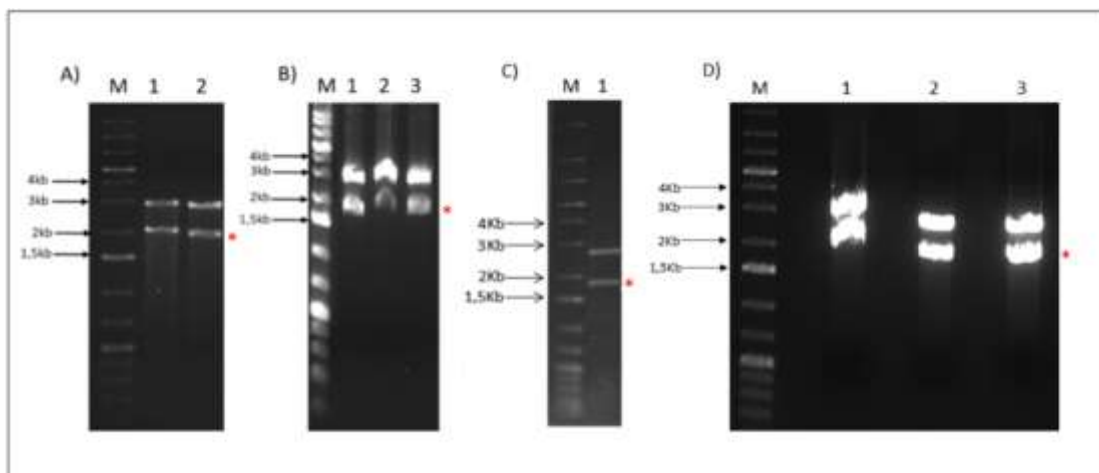
Os vetores de clonagem pUC57 contendo o gene da termolisina LIC13322 com mutações no sítio catalítico HEXXH (mutações AEXXH, HAXXH e HEXA) foram obtidos comercialmente. Tanto a histidina (H) quanto o ácido glutâmico (E) são considerados essenciais para a ação das termolisinas, e por isso foram escolhidos como alvos para mutação, sendo substituídos pela alanina (A) de forma pontual, com o intuito de abolir a atividade proteolítica da proteína. Após transformação e extração dos plasmídeos, estes vetores foram digeridos com as enzimas NcoI e KpnI para obtenção dos fragmentos contendo as mutações desejadas (Figura 15).

Figura 15. Análise da digestão dos plasmídeos contendo os genes *LIC10715*, *LIC13320* e *LIC13321* clonados no vetor pGem-T easy com as enzimas *XhoI* e *NcoI* e dos mutantes em *HEXXH* em vetor pUC57 digeridos com enzimas *NcoI* e *KpnI*. A) M - Marcador 1kb plus Invitrogen, 1 - clone *LIC10715*, 2 - clone *LIC13320*. B) M - Marcador 1kb plus Invitrogen, 1 - clone *LIC13321*. C) M - Marcador 1kb plus Invitrogen, 1 - clone AEXXH, 2 - clone HAXXH, 3 - clone AEXXH. Nas imagens é possível observar a liberação dos insertos (indicados por asteriscos) após digestão com as enzimas de restrição específicas.



Em seguida, procedeu-se à subclonagem dos genes no vetor de expressão pAE. Conforme mostrado na Figura 16, todos os fragmentos de interesse foram devidamente inseridos no vetor pAE, tendo sido liberados por digestão com as enzimas *XhoI/NcoI* e *NcoI/KpnI* (fragmentos de aproximadamente 2 kb). Todos os clones obtidos foram submetidos a sequenciamento para confirmação de clonagem e integridade gênica.

Figura 16. Clonagem dos genes *LIC10715*, *LIC13320* e *LIC13321* e mutantes HEXXH no vetor de expressão pAE digerido com as enzimas *Xho*I e *Nco*I. **A) *LIC10715*. M- Marcador 1kb plus Invitrogen®, 1- Produto de digestão do clone *LIC10715*pAE-C1, 2- Produto de digestão do clone *LIC10715*pAE-C2. **B)** *LIC13320*. M- Marcador 1kb plus Invitrogen®, 1- Produto de digestão do clone *LIC13320*pAE-C1, 2- Produto de digestão do clone *LIC13320*pAE-C2. 3- Produto de do clone *LIC13320*pAE-C3. **C)** *LIC13321*. M- Marcador 1kb plus Invitrogen®, 1- Produto de digestão do clone *LIC13321*pAE-C1. **D)** Mutantes no sítio catalítico HEXXH. M- Marcador 1kb plus Invitrogen®, 1- Produto de digestão do clone AEXXH, 2- Produto de digestão do clone HAXXH, 3- Produto de digestão do clone HEXA. Os insertos estão indicados por asteriscos.**



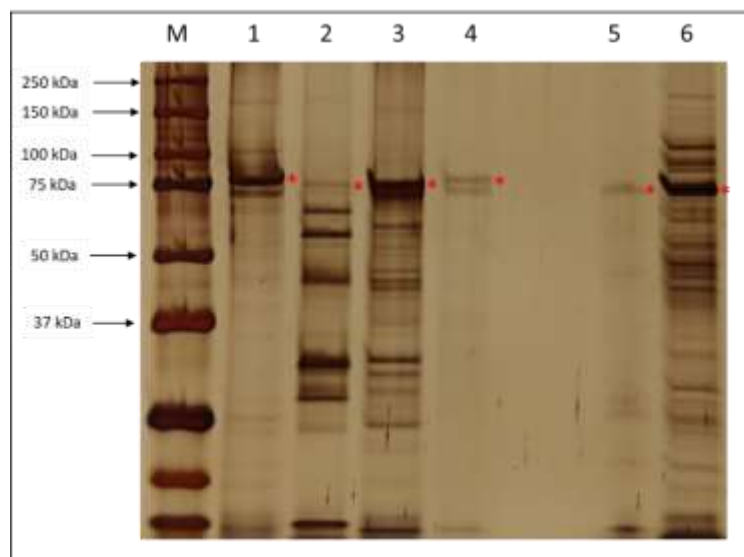
4.3 Expressão das proteínas recombinantes

As construções em pAE das termolisinas *LIC10715*, *LIC13320*, *LIC13321* e as construções em pUC57 com mutações no sítio catalítico HEXXH foram utilizadas para transformar a cepa de *E. coli* BL21 – SI. A indução da expressão foi feita por NaCl e todas as proteínas foram expressas na fração insolúvel. A *LIC13322* com a alteração HEXXA não pôde ser expressa e, portanto, não foi incluída nos ensaios proteolíticos.

Para obtenção das proteases recombinantes adotou-se um processo de solubilização e renaturação das proteínas em uma só etapa, em condições de alta pressão hidrostática (colaboração com as Dras. Rosa Chura-Chambi e Lígia Morganti, IPEN-USP). A aplicação da tecnologia de alta pressão se apresenta como uma opção eficiente na obtenção de proteínas funcionais a partir de corpúsculos de inclusão. Esta metodologia se diferencia de protocolos tradicionais por ser uma técnica branda de renaturação que promove a solubilização de agregados proteicos, conservando as estruturas secundária e terciária semelhantes às das proteínas nativas, estruturas estas que em geral estão presentes nos corpúsculos de inclusão. Assim, quando são aplicadas pressões da ordem de 2-3 kbar, os agregados proteicos podem ser dissociados, desfavorecendo interações intermoleculares hidrofóbicas e eletrostáticas em condições brandas, evitando a necessidade de utilização de

altas concentrações de reagentes desnaturantes para a dissociação de proteínas agregadas e mantendo as estruturas semelhantes às nativas. Após a renaturação e purificação das quatro termolisinas obtidas realizamos eletroforese em gel de poliacrilamida para visualização dos perfis proteicos. Na Figura 17 é possível observar um dos géis obtidos com as quatro proteínas corado por prata, assim como com os dois mutantes no sítio ativo. As proteínas LIC13320, LIC13321 e LIC13322-HAAXXH apresentam produtos de degradação, observados em diferentes levas de purificação. Acreditamos que essas termolisinas sofram auto-proteólise, como descrito para metaloproteases de outras espiroquetas, como a palilisina(HOUSTON et al., 2012). No entanto, esse processo não afeta sua funcionalidade, conforme atestam os ensaios proteolíticos mostrados abaixo. Todas as termolisinas recombinantes mostraram-se ativas e as proteínas mutantes no sítio catalítico HEXXH mostraram-se inativas.

Figura 17. Termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321, LIC13322 e mutantes AEXXH e HAXXH purificadas. Gel de poliacrilamida 10% corado com prata das termolisinas recombinantes purificadas e renaturadas. A massa molecular média estimada para as quatro proteínas é de aproximadamente 72 kDa (asteriscos). **M:** Marcador de peso molecular Kaleidoscope; **1:** LIC10715; **2:** LIC13320; **3:** LIC13321; **4:** LIC13322; **5:** AEXXH; **6:** HAXXH.

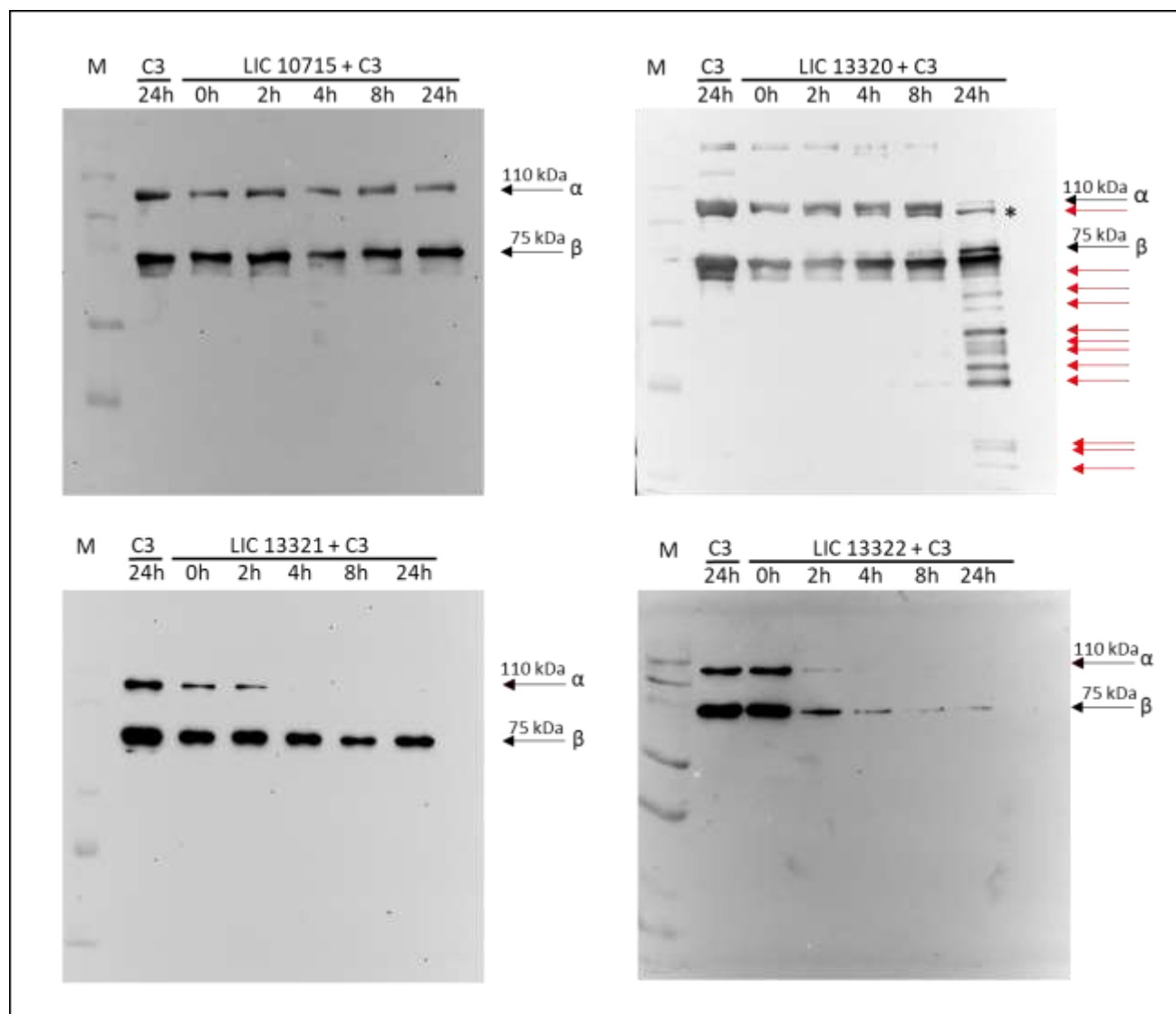


4.4 Avaliação da atividade proteolítica das termolisinas codificadas pelas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre as proteínas do sistema complemento (C3, C3b, C4, C4b, C5, C6, C7, C8 e C9)

O primeiro substrato testado foi a proteína C3 do sistema complemento humano, já que possui um papel central na cascata de ativação deste sistema pelas três vias (via clássica, das lectinas e alternativa). Como apresentado na Figura 18, todas as termolisinas recombinantes obtidas, exceto a LIC10715, foram capazes de clivar a cadeia α de C3 na concentração de 2 μ g. Completa degradação desta cadeia foi observada pela LIC13321 após 4 h de incubação, o que atesta sua melhor eficiência na degradação deste substrato, quando comparada às demais termolisinas. Uma molécula “C3b-like”, com cerca de 10 kDa a menos que a molécula de C3, foi gerada após incubação com a LIC13320. Isso é interessante, uma vez que C3b é alvo de degradação de Fator I (uma serinoprotease da cascata do complemento) na presença de Fator H (co-fator de Fator I). Uma vez degradado C3b, a ativação da cascata não prosseguiria pela via alternativa. Além disso, bandas múltiplas, de tamanhos variados, também foram geradas no tempo de 24 h na presença da LIC13320, não estando presentes nas incubações envolvendo as outras três termolisinas. Globalmente, os dados indicam que C3 é alvo de três termolisinas presentes nas espécies de leptospiros patogênicos e que os padrões de clivagem apresentam algumas diferenças no que diz respeito à eficiência e aos produtos de degradação gerados.

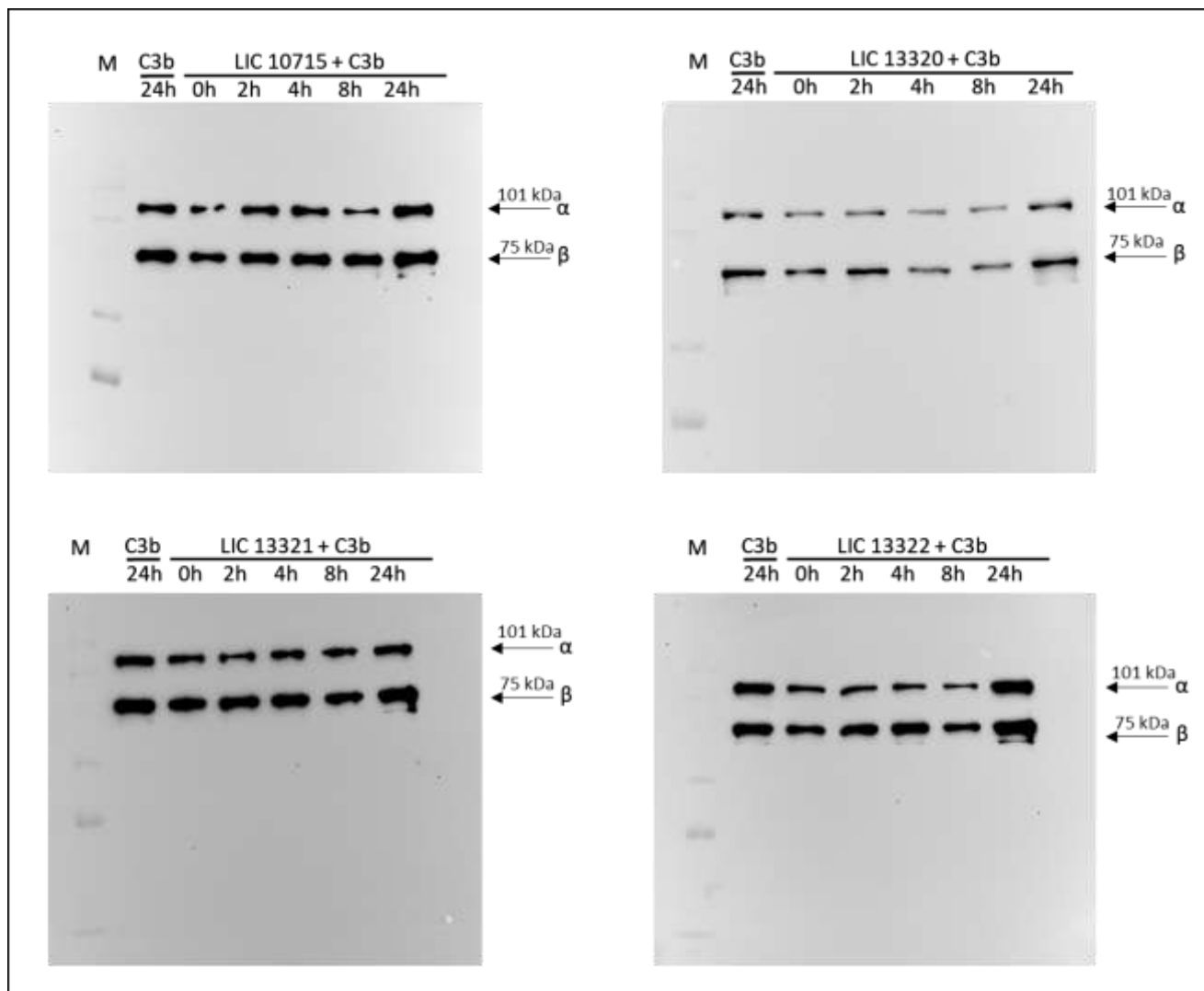
Trabalhos anteriores do nosso grupo já haviam demonstrado que LIC13322 é capaz de clivar o componente C3 do sistema complemento humano (FRAGA et al., 2014a; FRAGA; ISAAC; BARBOSA, 2016; CHURA-CHAMBI et al., 2018). No presente trabalho mostramos que C3 é alvo de duas outras termolisinas de *Leptospira*. É possível que a bactéria se beneficie de um efeito aditivo desta atividade proteolítica contra C3, uma molécula-chave da cascata do complemento.

Figura 18. Atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre o componente C3 do sistema complemento humano. Cada termolisina (2 µg) foi incubada com a proteína C3 (0,5 µg) por 0h, 2h, 4h, 8h e 24h a 37°C. Os produtos de clivagem foram detectados por Western blot com anti-C3 humano. Os produtos de degradação das cadeias α e β estão indicados por setas vermelhas, e as cadeias íntegras estão indicadas por setas pretas. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como 'M' na figura. A molécula "C3b-like" gerada a partir da degradação com LIC13320 está indicada por um asterisco.



A atividade das termolisinas sobre C3b também foi avaliada. Neste caso, diferentemente do que foi observado com C3, nenhuma das termolisinas testadas foi capaz de degradar o substrato utilizando-se 2 µg de proteína em períodos de incubação de até 24 h. É possível observar nos resultados um fragmento abaixo da cadeia β, também presente nos controles (molécula C3b incubada com PBS por 24h a 37°C), indicando, provavelmente, uma degradação espontânea da molécula.

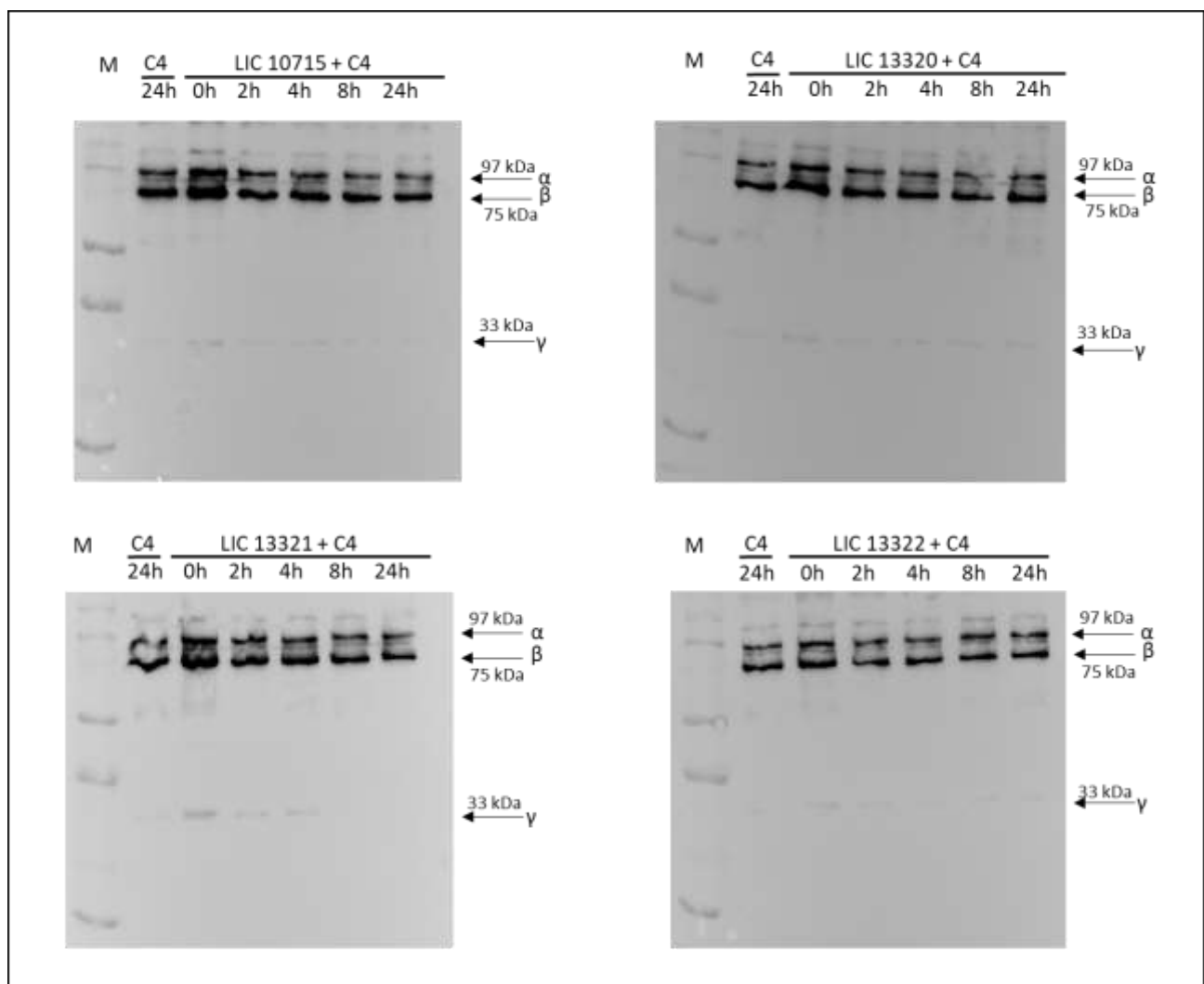
Figura 19. Atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre o componente C3b do sistema complemento humano. As termolisinas (2 µg) foram incubadas com a proteína C3b (0,5 µg) por 0h, 2h, 4h, 8h e 24h a 37 °C. Os produtos de clivagem foram detectados por Western blot com anti-C3 humano. As setas pretas indicam as cadeias α e β íntegras. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.

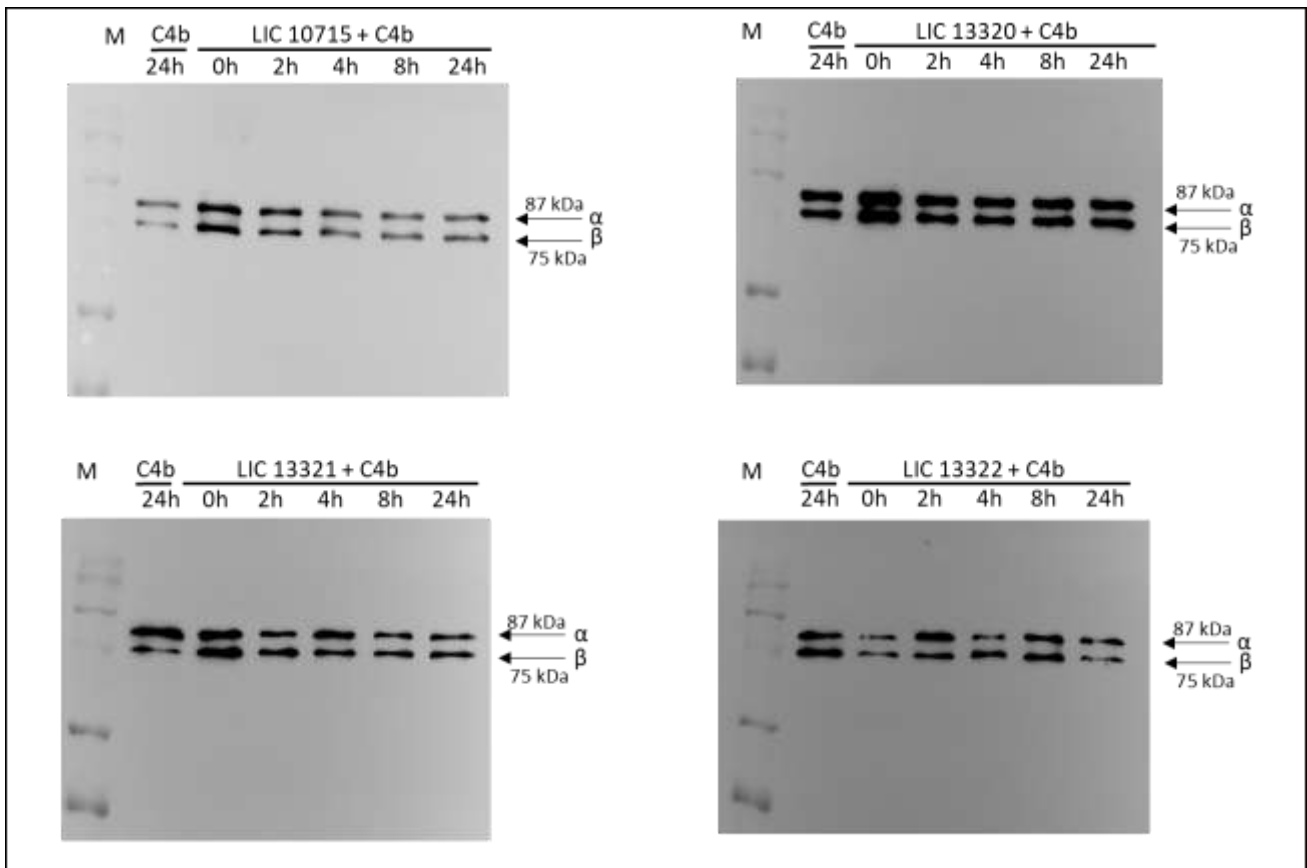


No que diz respeito à atividade proteolítica sobre C4 e C4b é possível observar que nenhuma das termolisinas foi capaz de degradar os substratos de forma consistente, mesmo no tempo de incubação de 24 horas (Figura 20). A degradação destes componentes, que participam das vias clássica e das lectinas do complemento, por termolisinas de outras bactérias não foi reportado na literatura até o momento, sugerindo que essas duas vias não representam um alvo para essa classe de metaloproteases. Em um trabalho anterior do grupo, proteases presentes no sobrenadante de cultura de leptospiras patogênicas não tiveram ação proteolítica sobre C4, mas a cadeia α' de C4b foi totalmente degradada na presença deste mesmo sobrenadante (FRAGA et al., 2014b). É possível que sítios

proteolíticos na cadeia α de C4 só se tornem expostos quando esta cadeia de C4 é clivada produzindo C4b α' , e que este produto de clivagem seja gerado por outra protease secretada, que não a termolisina.

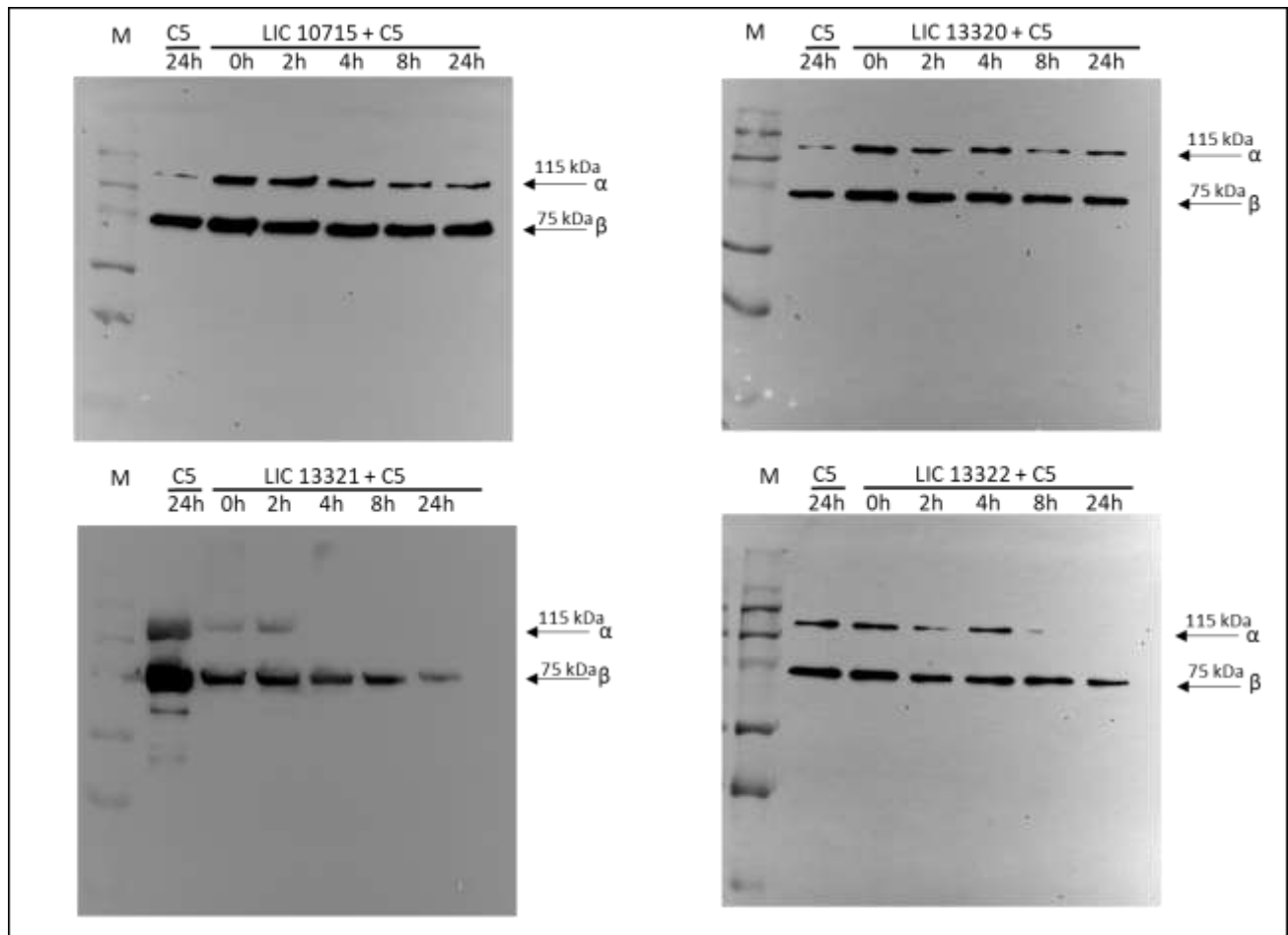
Figura 20. Atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre o componente C4 e C4b do sistema complemento humano. As termolisinas (2 μ g) foram incubadas com as proteínas C4 e C4b (0,5 μ g) por 0h, 2h, 4h, 8h e 24h a 37 °C. Os produtos de clivagem foram detectados por Western blot com anti-C4 humano. As setas pretas indicam as cadeias α , β e γ íntegras. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.





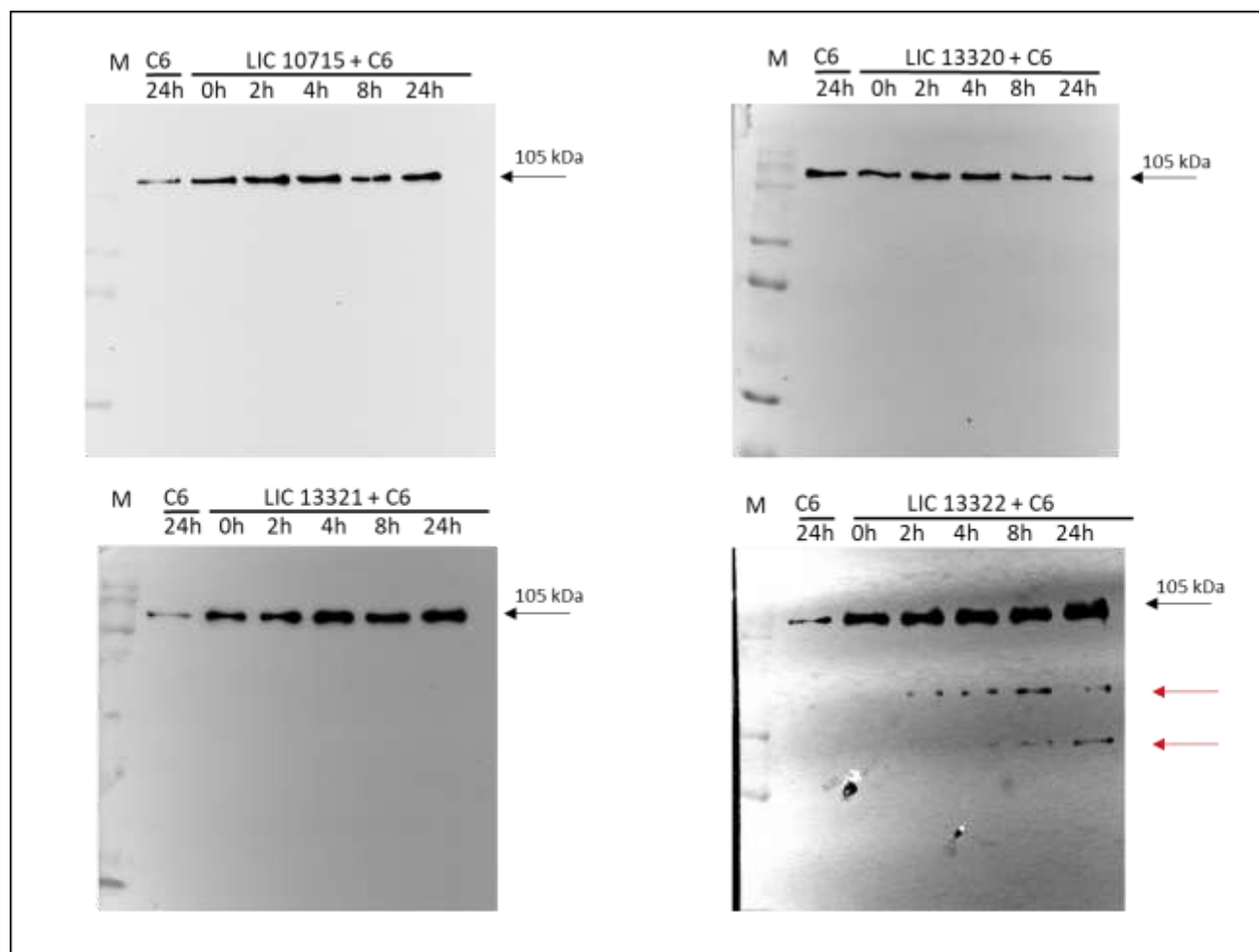
Em relação ao componente C5, as proteínas LIC13321 e LIC13322 foram as únicas a degradarem sua cadeia α após 4 e 8 horas de incubação respectivamente. Apesar de uma discreta redução na intensidade da banda referente à cadeia α nas incubações com as termolisinas LIC10715 e LIC13320, não acreditamos que essa leve degradação tenha um impacto funcional, principalmente porque não difere dos controles (substrato em PBS por 24h) (Figura 21).

Figura 21. Atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre o componente C5 do sistema complemento humano. As termolisinas (2 µg) foram incubadas com a proteína C5 (0,5 µg) por 0h, 2h, 4h, 8h e 24h a 37°C. Os produtos de clivagem foram detectados por Western blot com anti-C5 humano. As cadeias íntegras estão indicadas por setas pretas. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.



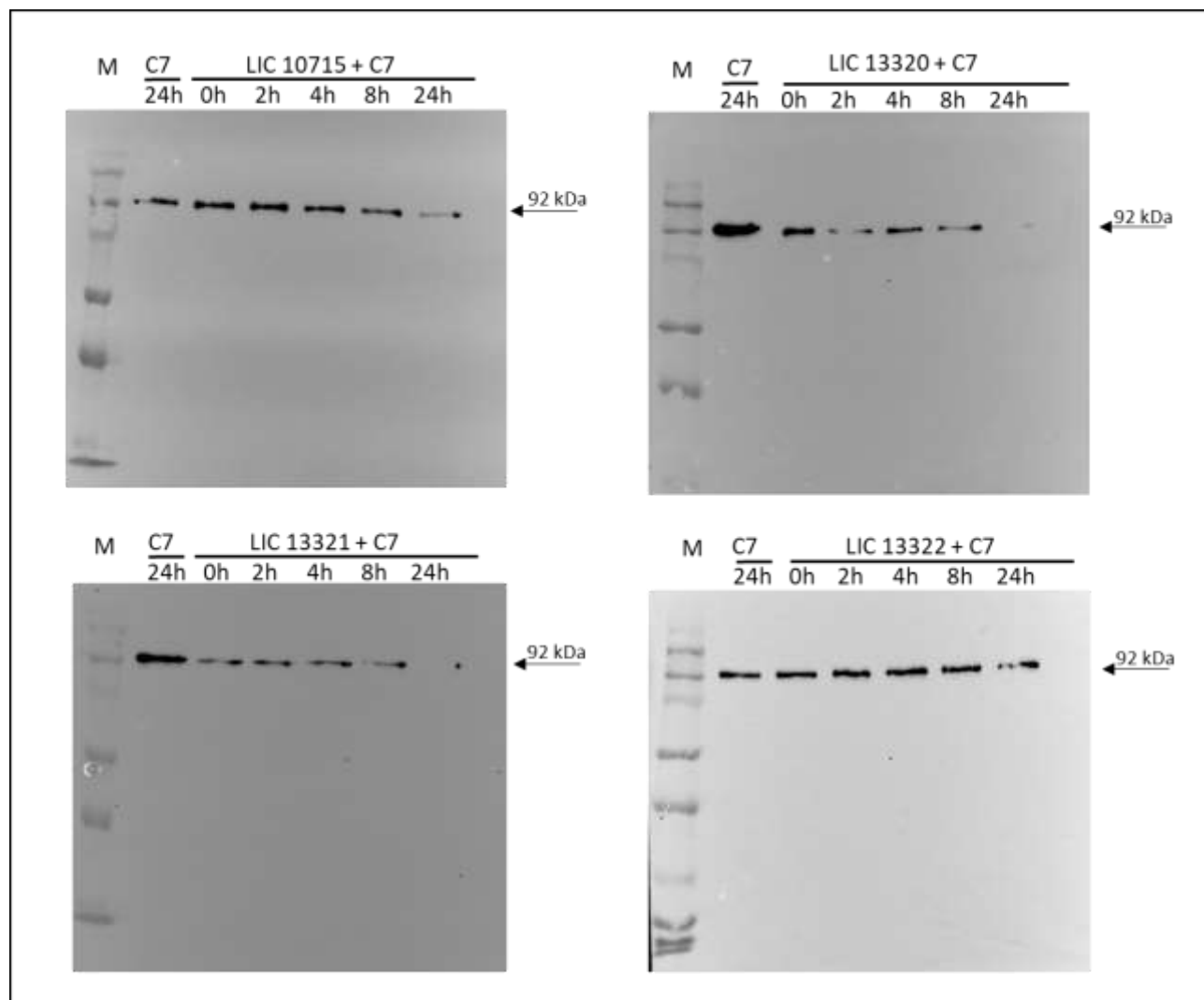
O componente de cadeia única C6 também foi avaliado quanto à degradação pelas termolisinas, e somente a proteína LIC13322 foi capaz de clivá-lo (Figura 21), confirmando dados já publicados por AMAMURA et al., (2017), que demonstraram a degradação tanto de C6 purificado quanto de C6 presente no complexo de ataque à membrana solúvel (SC5b-9). Um fato interessante a ser ressaltado é a rápida degradação da molécula pela enzima, uma vez que na incubação de 2 horas já é possível observar o aparecimento de bandas de degradação (Figura 22).

Figura 22. Atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre o componente C6 do sistema complemento humano. As termolisinas (2 µg) foram incubadas com a proteína C6 (0,5 µg) por 0h, 2h, 4h, 8h e 24h a 37°C. Os produtos de clivagem foram detectados por Western blot com anti-C6 humano. Os produtos de degradação estão indicados por setas vermelhas, e as cadeias íntegras estão indicadas por setas pretas. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.



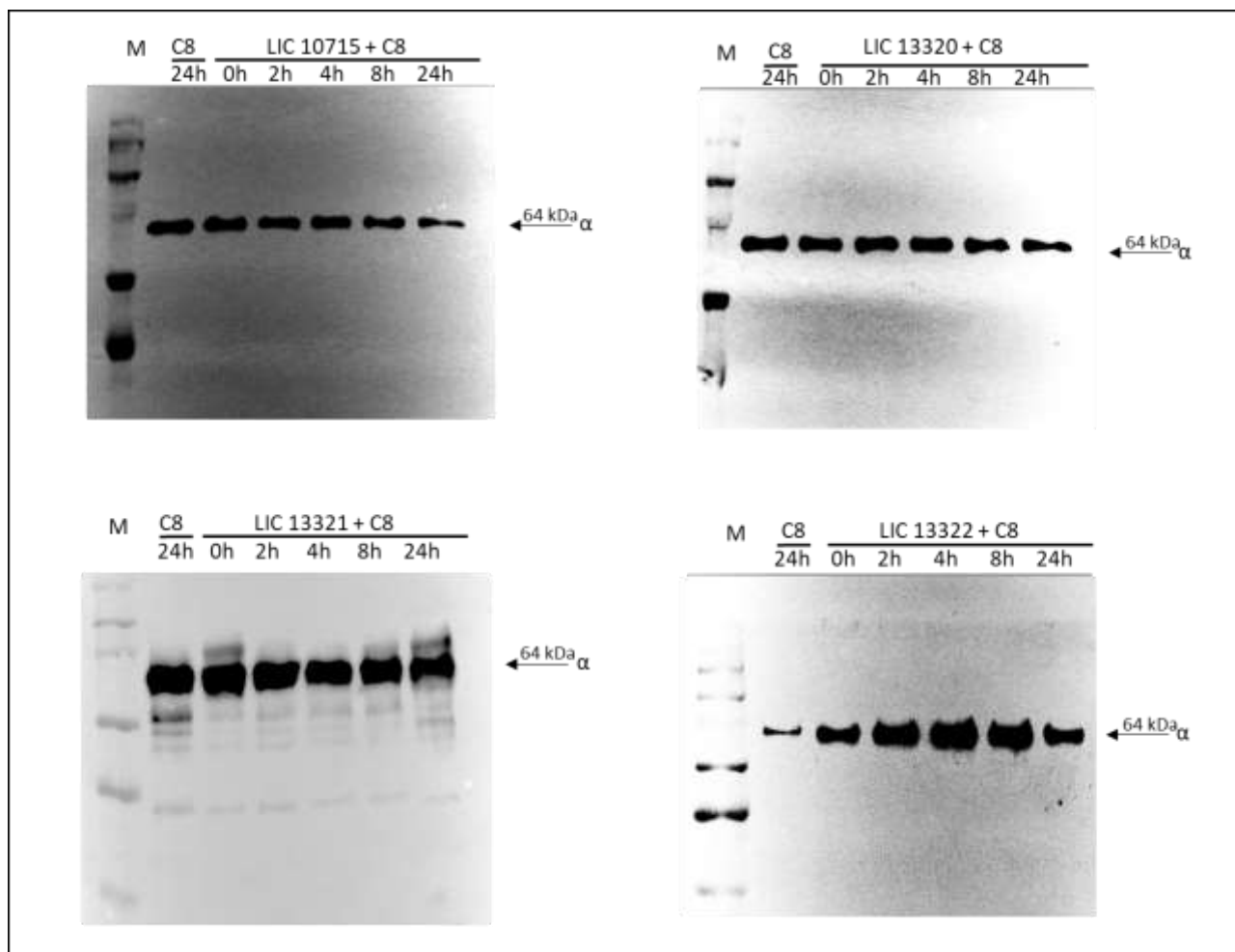
Diferentemente do que foi observado para C6, a termolisina LIC13322 foi incapaz de clivar o componente C7. A degradação observada com as demais termolisinas foi sutil, sendo mais marcante após 24 horas de incubação (Figura 23). No entanto esta degradação não se confirmou para LIC10715 no ensaio dose - resposta (dados não mostrados).

Figura 23. Atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre o componente C7 do sistema complemento humano. As termolisinas (2 µg) foram incubadas com a proteína C7 (0,5 µg) por 0h, 2h, 4h, 8h e 24h a 37°C. Os produtos de clivagem foram detectados por Western blot com anti-C7 humano. A cadeia íntegra de C7 está indicada por setas pretas. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.



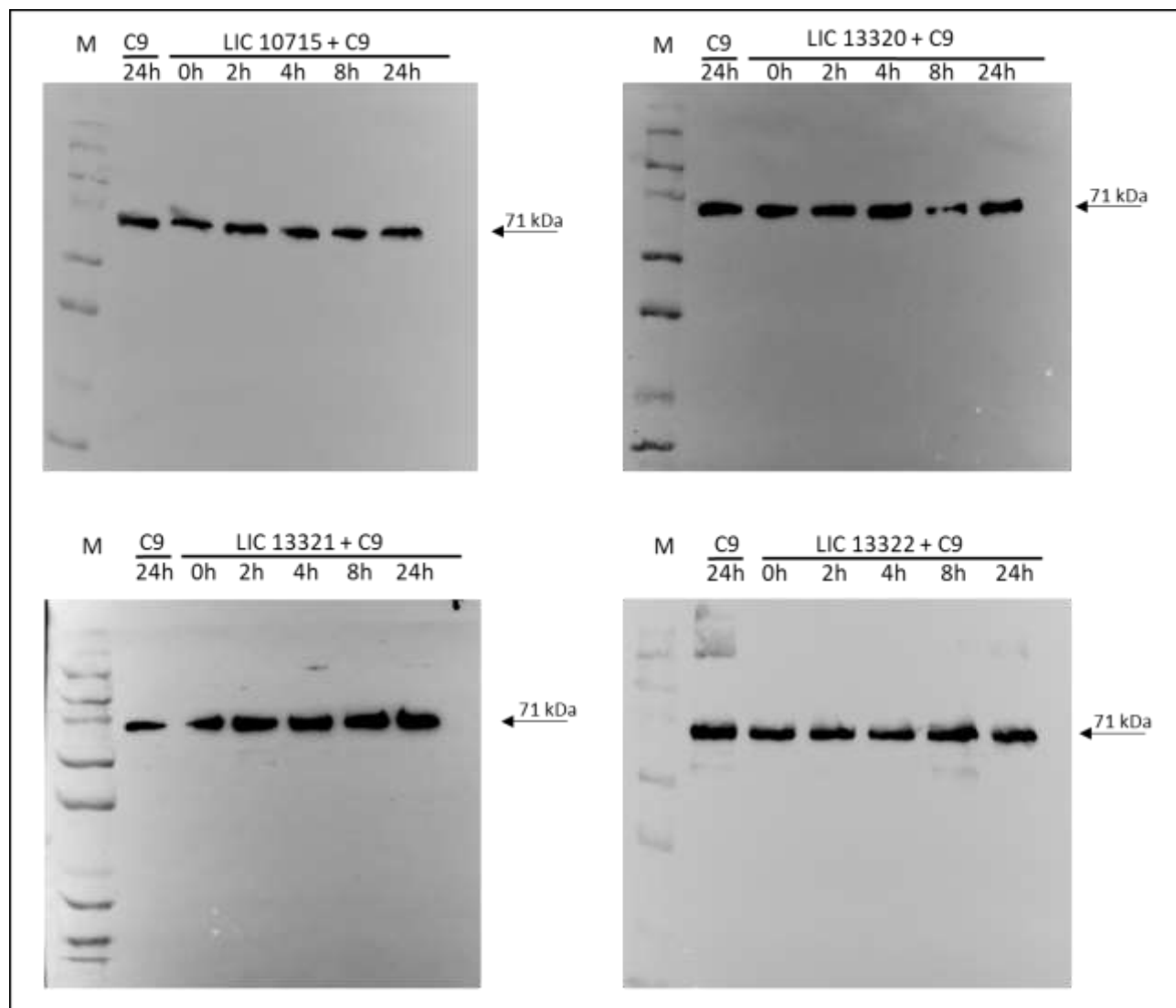
No que diz respeito a C8, nenhuma das termolisinas foi capaz de degradar substancialmente a molécula mesmo após 24 horas de incubação (Figura 24). No ensaio com a LIC10715 uma leve diminuição da intensidade da cadeia α no tempo de 24 horas foi observada.

Figura 24. Atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre o componente C8 do sistema complemento humano. As termolisinas (2 µg) foram incubadas com a proteína C8 (0,5 µg) por 0h, 2h, 4h, 8h e 24h a 37°C. Os produtos de clivagem foram detectados por Western blot com anti-C8 humano. As cadeias α de C8 estão indicadas por setas pretas. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.



Por fim o ensaio proteolítico com a molécula C9 revelou que, assim como C8, este componente não é alvo das termolisinas de *Leptospira* (Figura 25).

Figura 25. Atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre o componente C9 do sistema complemento humano. As termolisinas (2 µg) foram incubadas com a proteína C9 (0,5 µg) por 0h, 2h, 4h, 8h e 24h a 37°C. Os produtos de clivagem foram detectados por Western blot com anti-C9 humano. A cadeia íntegra de C9 está indicada por setas pretas. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.



A Tabela 3 resume os achados obtidos relacionados às degradações observadas com os diversos componentes do sistema complemento. De uma forma geral, o que se nota ao compararmos a atividade das quatro termolisinas sobre componentes do sistema complemento é que as proteínas LIC13321 e LIC13322 parecem ser mais eficientes quando comparadas às demais, seguida da LIC13320, na concentração de 2 µg. Nesta concentração e sobre estes componentes do sistema complemento a LIC10715 não apresentou atividade proteolítica.

Tabela 3. Degradação de proteínas do sistema complemento por termolisinas

	C3	C3b	C4	C4b	C5	C6	C7	C8	C9
LIC10715									
LIC13320	Degradação parcial da cadeia α , gerando fragmentos menores						Degradação completa		
LIC13321	Degradação completa da cadeia α , sem aparecimento de novos fragmentos				Degradação completa da cadeia α , sem aparecimento de novos fragmentos		Degradação completa		
LIC13322	Degradação completa da cadeia α , sem aparecimento de novos fragmentos				Degradação completa da cadeia α , sem aparecimento de novos fragmentos	Degradação parcial gerando fragmentos menores			
Legenda:	Sem degradação	Degradação em 2 horas	Degradação em 4 horas	Degradação em 8 horas	Degradação em 24 horas				

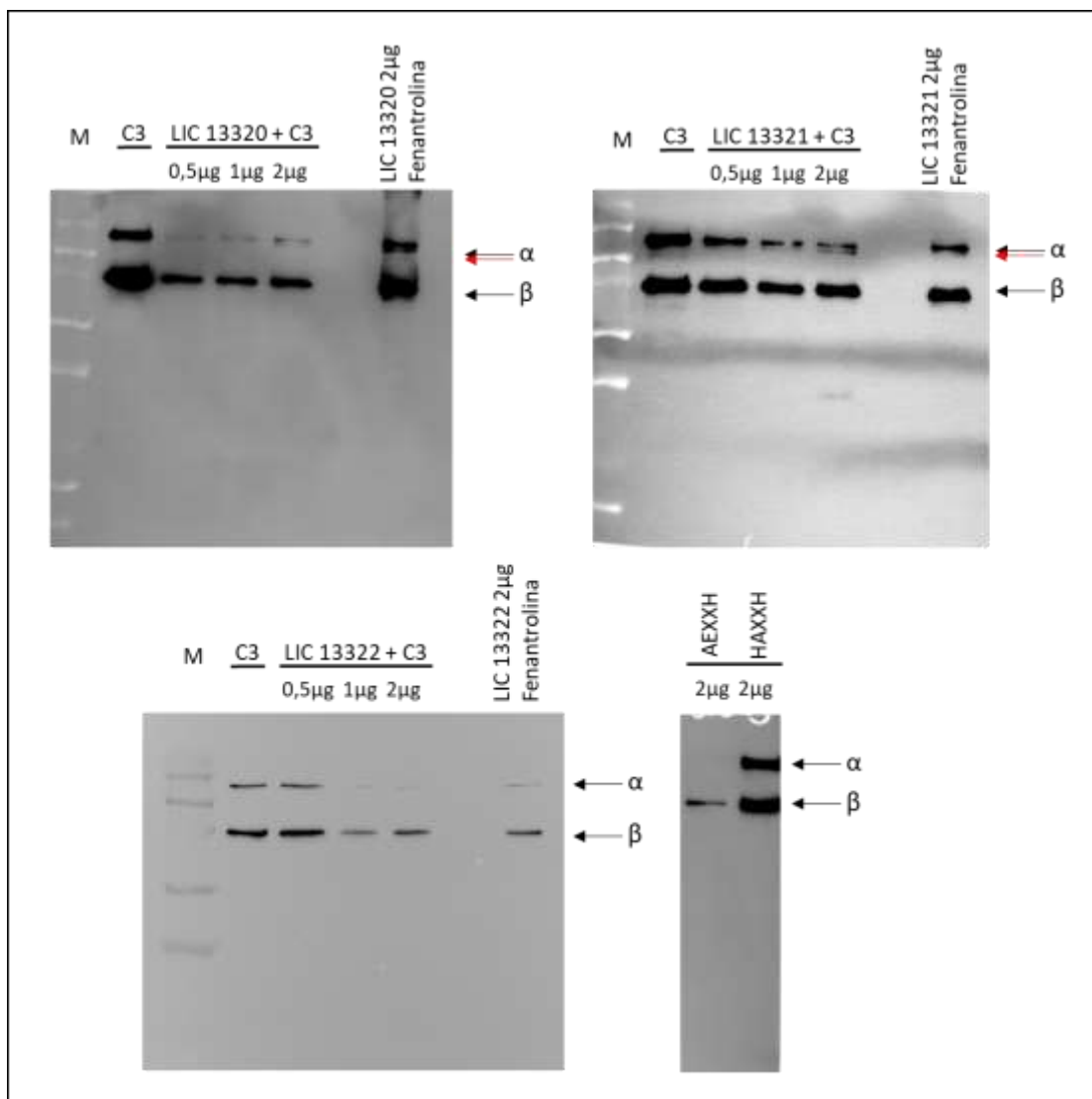
4.4.1 Avaliação da atividade proteolítica de diferentes doses das termolisinas recombinantes sobre os diversos substratos.

Uma vez determinado o tempo de degradação para cada substrato, foram realizados testes com diferentes quantidades das proteínas recombinantes (0,5, 1 e 2 μg) para estimar a menor quantidade necessária para degradação de cada substrato. Ensaio de inibição com o composto 1-10 fenantrolina, e com a LIC13322 contendo alterações no sítio catalítico (AEXXH e HAXXH) também foram realizados. A obtenção da proteína a partir do clone HEXXA não foi satisfatória, mesmo após a testagem de várias condições de indução e, portanto, essa proteína não foi utilizada nos ensaios.

O primeiro perfil de degradação dose resposta foi o da molécula C3. Como esperado, todas as proteínas testadas foram capazes de clivar a cadeia α de C3 após 24 horas de incubação utilizando 2 μg de proteína. A LIC13320 foi capaz de clivar C3 mesmo na concentração mais baixa testada (0,5 μg), sendo, portanto, a termolisina mais eficiente na clivagem de C3. A LIC13321 apresenta degradação gerando a proteína C3b-like e LIC13322 apresentou degradação total da cadeia α com 1 μg de proteína. Em todos os casos a 1-10 fenantrolina foi capaz de inibir a ação das proteases. Com relação aos mutantes é possível observar que HAXXH não clivou a molécula alvo, sendo este um indicativo de que o segundo

aminoácido do sítio catalítico HEXXH é o mais importante para a proteólise de C3, uma vez que AEXXH foi capaz de clivar a molécula (Figura 26).

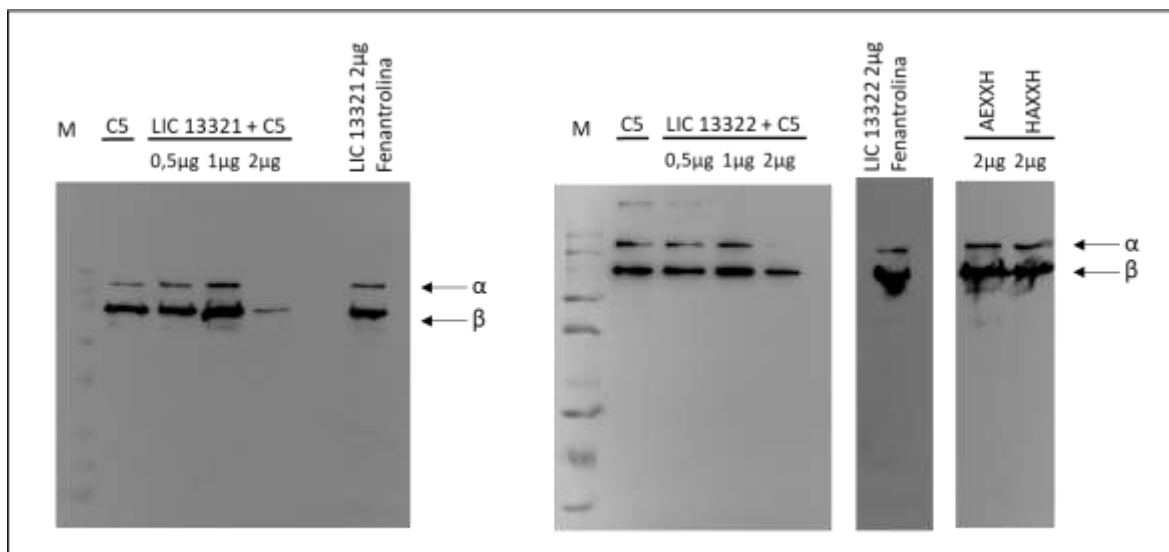
Figura 26. Atividade proteolítica das termolisinas LIC13320, LIC13321 e LIC13322 e mutantes (LIC13322/AEXXH e LIC13322/HAXXH) sobre o componente C3 do sistema complemento humano. As termolisinas (0,5, 1 e 2 µg) foram incubadas com a proteína C3 (0,5 µg) por 24h a 37°C. Os produtos de clivagem foram detectados por Western blot com anti-C3 humano. A cadeia íntegra de C3 está indicada por setas pretas, e o produto de degradação α' está indicado por setas vermelhas. O controle com termolisina inibida por 1-10 fenantrolina está indicado. As incubações com as proteínas mutantes no sítio catalítico HEXXH foram realizadas utilizando 2 µg de cada proteína. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.



A avaliação da clivagem de C5 utilizando diferentes doses foi realizada com as proteínas LIC13321 e LIC13322, pois ambas haviam degradado este componente da cascata do complemento. Nestes casos houve o desaparecimento da cadeia α apenas na presença de 2 µg de proteína. Os controles com 1-10 fenantrolina não foram capazes de

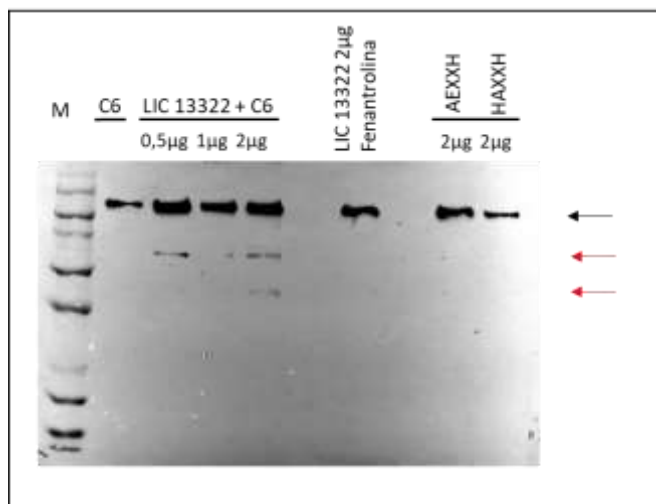
clivar a molécula alvo, assim como os mutantes AEXXH e HAXXH, o que nos leva a crer que os dois aminoácidos mutados são importantes para esta clivagem (Figura 27).

Figura 27. Atividade proteolítica das termolisinas LIC13321 e LIC13322 e mutantes (LIC13322/AEXXH e LIC13322/HAXXH) sobre o componente C5 do sistema complemento humano. As termolisinas (0,5, 1 e 2 µg) foram incubadas com a proteína C5 (0,5 µg) por 24h a 37°C. Os produtos de clivagem foram detectados por Western blot com anti-C5 humano. A cadeia íntegra de C5 está indicada por setas pretas. O controle com termolisina inibida por 1-10 fenantrolina está indicado. As incubações com proteína mutante no sítio catalítico HEXXH foram realizadas utilizando 2 µg de cada proteína. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.



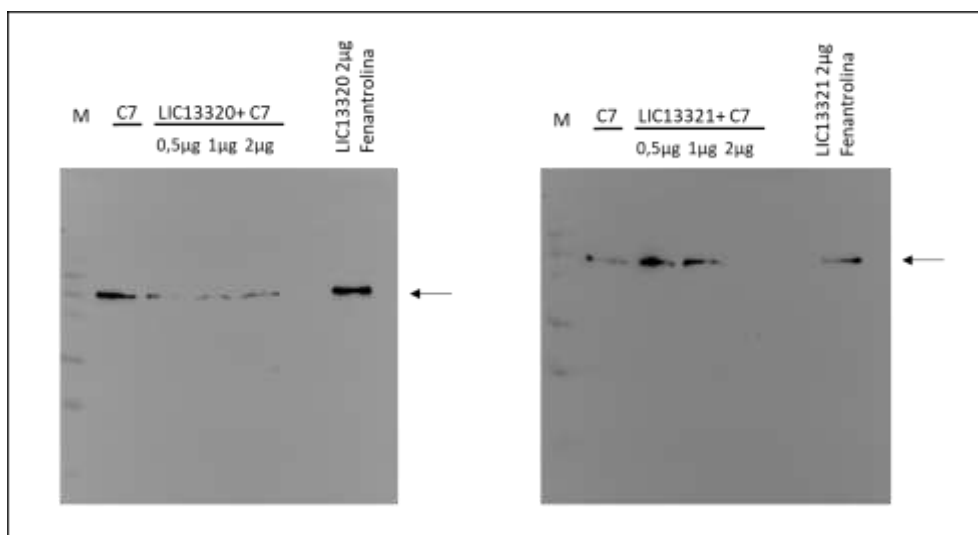
A clivagem de C6 foi avaliada utilizando diferentes doses da proteína LIC13322, uma vez que foi a única capaz de degradar este componente (Figura 28). Já é possível observar fragmentos provenientes da degradação (indicados por setas vermelhas) a partir da menor concentração de termolisina utilizada, mas a clivagem é mais proeminente na maior dose utilizada. Os controles com 1-10 fenantrolina, assim como os controles com proteínas mutantes no domínio catalítico HEXXH não foram capazes de clivar C6, como já era esperado.

Figura 28. Atividade proteolítica da termolisina LIC13322 e mutantes (LIC13322/AEXXH e LIC13322/HAXXH) sobre o componente C6 do sistema complemento humano. A termolisina (0,5, 1 e 2 µg) foi incubada com a proteína C6 (0,5 µg) por 24h a 37°C. Os produtos de clivagem foram detectados por Western blot com anti-C6 humano. A cadeia íntegra de C6 está indicada por setas pretas, e os produtos de degradação estão indicados por setas vermelhas. O controle com termolisina inibida por 1-10 fenantrolina está indicado. As incubações com proteína mutante no sítio catalítico HEXXH foram realizadas utilizando 2 µg de cada proteína. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.



Por fim foi realizado o ensaio de degradação dose resposta com a molécula C7 do sistema complemento humano com as termolisinas LIC13320 e LIC13321. No caso da LIC13320 é possível verificar total degradação da molécula utilizando a menor quantidade da proteína recombinante purificada, e com a LIC13321 a degradação ocorre somente com a dose mais elevada de 2 µg. A degradação em ambos os casos foi inibida por 1-10 fenantrolina (Figura 29).

Figura 29. Atividade proteolítica das termolisinas LIC13320 e LIC13321 e mutantes (LIC13322/AEXXH e LIC13322/HAXXH) sobre o componente C7 do sistema complemento humano. As termolisinas (0,5, 1 e 2 µg) foram incubadas com a proteína C7 (0,5 µg) por 24h a 37°C. Os produtos de clivagem foram detectados por Western blot com anti-C7 humano. A cadeia íntegra de C7 está indicada por setas pretas. O controle com termolisina inibida por 1-10 fenantrolina está indicado. As incubações com proteína mutante no sítio catalítico HEXXH foram realizadas utilizando 2 µg de cada proteína. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.



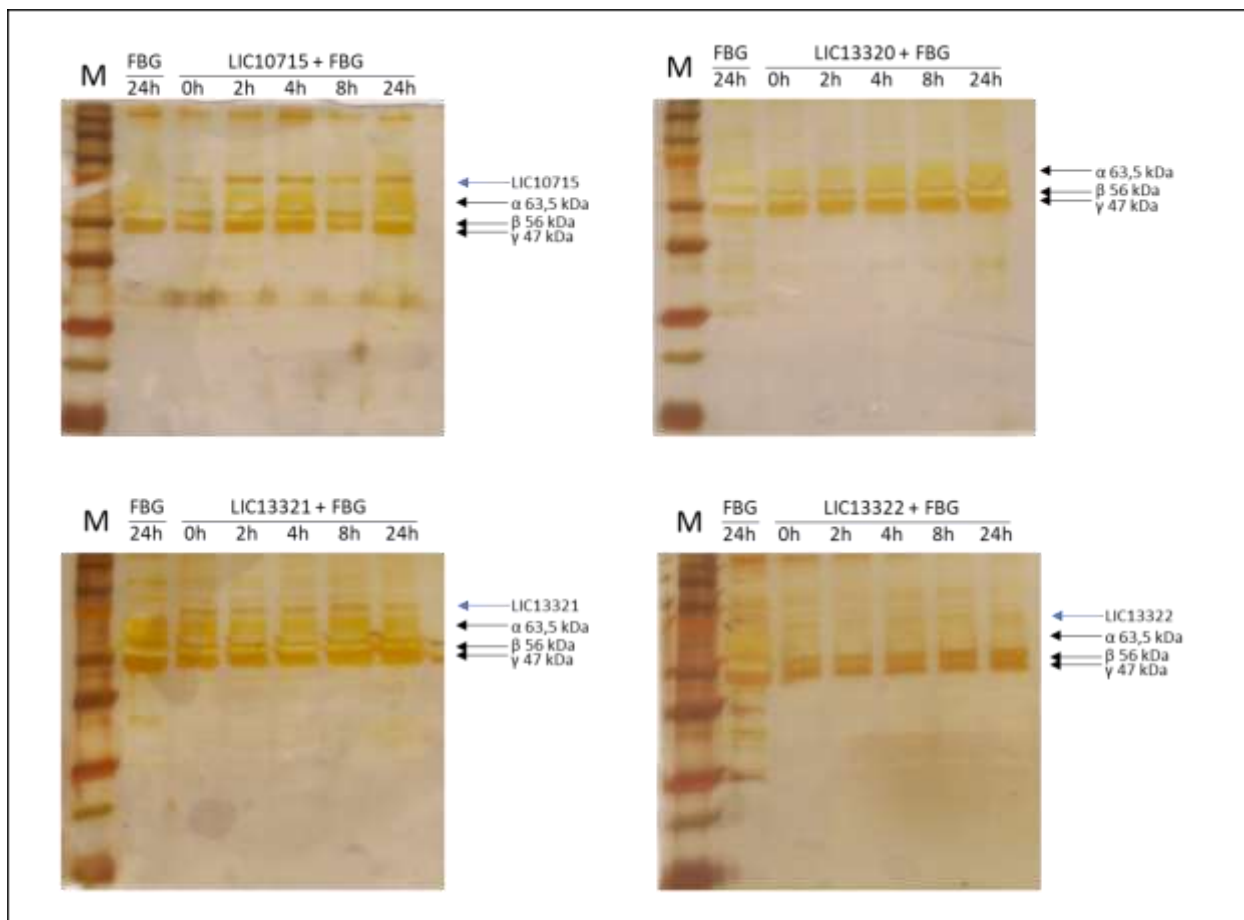
4.5 Avaliação da atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre proteínas da matriz extracelular (decorina, biglicam) e fibrinogênio

A atividade proteolítica das quatro termolisinas sobre as proteoglicanas decorina e biglicam, e sobre o fibrinogênio humano também foi avaliada neste trabalho.

O fibrinogênio é uma glicoproteína grande e complexa com três pares de cadeias polipeptídicas (cadeias α , β e γ) ligadas entre si, o qual é sintetizado no fígado pelos hepatócitos e liberado na circulação sanguínea. O fibrinogênio desempenha um papel fundamental na hemostasia, sendo um componente crucial da cascata de coagulação. Ainda, possui uma função importante na defesa do hospedeiro contra patógenos como uma proteína de matriz provisória rapidamente montada. A fibrina, derivada do fibrinogênio, pode funcionar como uma barreira inicial de proteção do hospedeiro, limitando o crescimento bacteriano e suprimindo a disseminação de microrganismos para locais distantes. No entanto, diversas bactérias possuem fatores de virulência capazes de degradar o fibrinogênio ou a fibrina, fato que contribui para o processo de invasão. (YA-PING KO, 2016 HALKIER, 1991; MOSESSON, 2005; WEISEL, 2005).

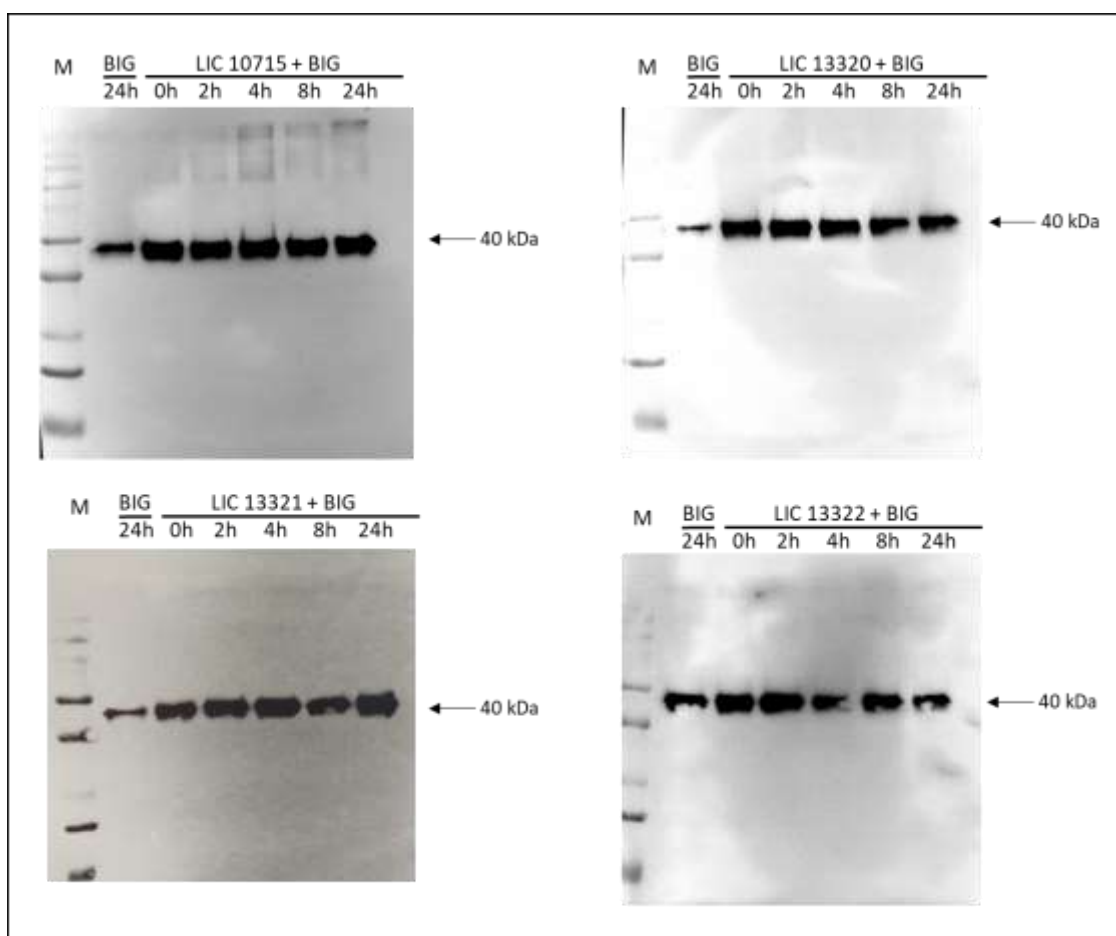
Embora já tenha sido descrita a degradação do fibrinogênio por metaloproteases secretadas por leptospiros patogênicos (SILVA et al., 2018), nenhuma das termolisinas (na concentração de 2 µg) foi capaz de clivar este componente (Figura 30), uma vez que nenhum fragmento de degradação pôde ser visto no gel, e as bandas correspondentes ao fibrinogênio não sofreram alteração em sua intensidade comparadas ao controle. Como neste caso os géis foram corados por prata, é possível observar bandas correspondentes às LIC10715, LIC13321 e LIC13322 na altura de 72kDa. No gel referente à LIC13320 não é possível observar a proteína pois, como já mencionado anteriormente, esta proteína apresenta-se mais degradada em relação às demais, fato que não alterou sua funcionalidade.

Figura 30. Atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre o fibrinogênio. As termolisinas (2 µg) indicadas por setas azuis com exceção da LIC13320 devido à autoproteólise) foram incubadas com fibrinogênio (10 µg – cadeias indicadas por setas pretas) por 0h, 2h, 4h, 8h e 24h a 37°C. Os produtos de incubação foram visualizados por SDS-PAGE 12% corado por prata. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.



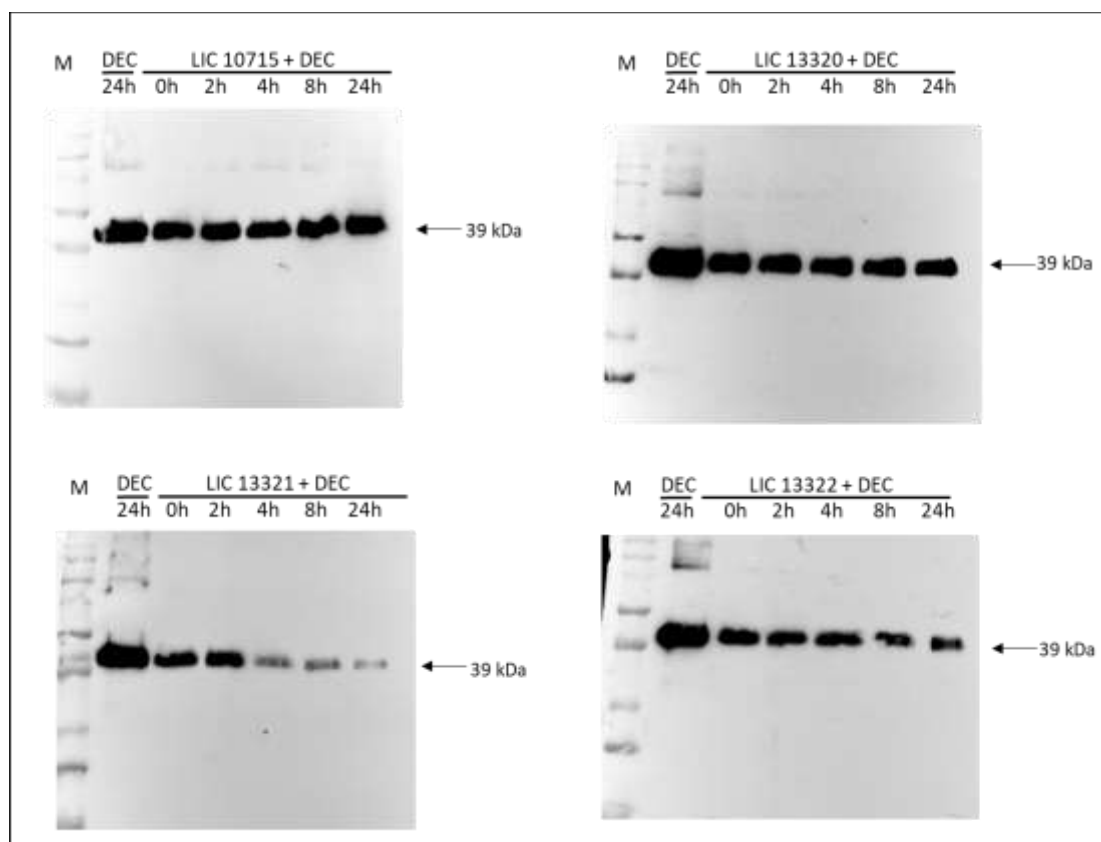
Visto que metaloproteases secretadas por leptospiros também degradam proteoglicanas (SILVA et al., 2018), avaliamos a ação das termolisinas sobre biglicam, uma proteoglicana pertencente à família “*small leucine-rich repeat proteoglycans*”, que possui propriedades de ligação ao colágeno (MOUW; OU; WEAVER, 2014). Esta molécula não sofreu degradação após incubação com 2 µg de cada termolisina (Figura 31).

Figura 31. Atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre o componente biglicam. As termolisinas (2 µg) foram incubadas com biglicam (1 µg) por 0h, 2h, 4h, 8h e 24h a 37°C. Os produtos de incubação foram detectados por Western-blot com anti-biglicam. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.



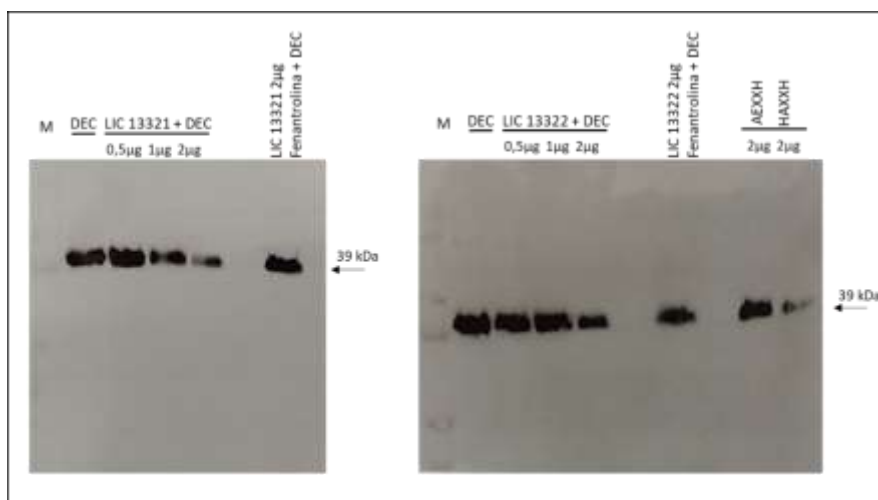
Outra proteoglicana da mesma classe a ser testada foi a decorina. Diferentemente do observado com a biglicam essa proteína foi degradada pelas LIC13321 e LIC13322 (Figura 32). É possível observar uma degradação progressiva pela LIC13321 a partir de 4 horas de incubação. Na presença da LIC13322 também houve diminuição da intensidade das bandas, embora mais sutil.

Figura 32. Atividade proteolítica das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 sobre o componente decorina. As termolisinas (2 µg) foram incubadas com o decorina (1 µg) por 0h, 2h, 4h, 8h e 24h a 37°C. Os produtos de incubação foram detectados por Western-blot com anti-decorina. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.



Um ensaio dose-resposta com as termolisinas LIC13321 e LIC13322 foi realizado utilizando decorina (Figura 33). Uma diminuição da intensidade das bandas foi observada somente com 2 µg de ambas as termolisinas. As degradações foram inibidas por 1-10 fenantrolina e, no caso da LIC13322, o mutante AEXXH perdeu a atividade proteolítica.

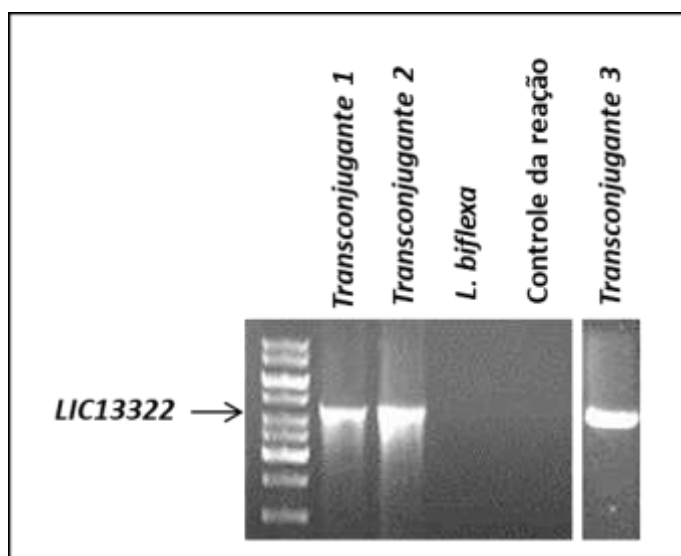
Figura 33. Atividade proteolítica das termolisinas LIC13321 e LIC13322 e mutantes (LIC13322/AEXXH e LIC13322/HAXXH) sobre o componente decorina. As termolisinas (0,5, 1 e 2 µg) foram incubadas com a proteína decorina (1 µg) por 24h a 37°C. Os produtos de clivagem foram detectados por Western blot com anti-decorina humano. A cadeia íntegra de decorina está indicada por setas pretas. O controle com termolisina inibida por 1-10 fenantrolina está indicado. As incubações com proteína mutante no sítio catalítico HEXXH foram realizadas utilizando 2 µg de cada proteína. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Invitrogen®) está indicado como M na figura.



4.6 Introdução do gene *LIC13322* na espécie não patogênica (*L. biflexa*)

Após inserção do gene *LIC13322* no vetor pMAoRI foi realizada transformação em *E. coli* β2163 e posterior conjugação na estirpe saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc. Três transconjugantes positivos foram obtidos na *L. biflexa*, conforme mostrado na Figura 34.

Figura 34. Amplificação do gene *LIC13322* nos transconjugantes *L. biflexa/LIC13322*. O gene *LIC13322* foi amplificado por PCR com os iniciadores utilizados para clonagem. O controle interno da reação e o controle negativo (*L. biflexa*) estão indicados. O amplicon do gene *LIC13322* (tamanho) referente aos três clones está indicado por uma seta.



4.7 Ensaio de resistência ao soro humano

A viabilidade bacteriana mediante tratamento com soro humano (como fonte de complemento) foi avaliada utilizando-se a resazurina. As bactérias (estirpes LPF, Patoc e transconjugantes 1B, 2B e 3B) foram incubadas com 25% de soro humano ativo e inativo e após 1h adicionou-se resazurina. A leitura das D.O.s foi realizada após 16h. A estirpe patogênica (virulenta) LPF sobreviveu igualmente na presença do soro ativo e inativo. A estirpe saprófita, Patoc, apresentou redução significativa em sua viabilidade na presença de soro ativo, assim como os transconjugantes 1B e 3B. A única estirpe transconjugante a não apresentar diferença significativa na sobrevivência em relação a estirpe patogênica LPF foi a 2B. A sobrevivência de duas das três transconjugantes em soro ativo não diferiu daquela apresentada pela estirpe saprófita Patoc, sugerindo que o gene *LIC13322* não confere, por si só, resistência ao soro. Interessante mencionar que, ao serem analisadas em microscopia de campo escuro após 1 hora de incubação com soro humano, as transconjugantes sobreviventes ainda estavam íntegras, porém imóveis, ao passo que boa parte das saprófitas (Patoc) já haviam sido completamente lisadas pelo complexo de ataque à membrana (MAC), ponto final da cascata do complemento. Especula-se, portanto, que a

presença da termolisina LIC13322 tenha provocado um retardamento na lise ocasionada pelo MAC, uma vez que esta proteína cliva proteínas-chave do sistema complemento.

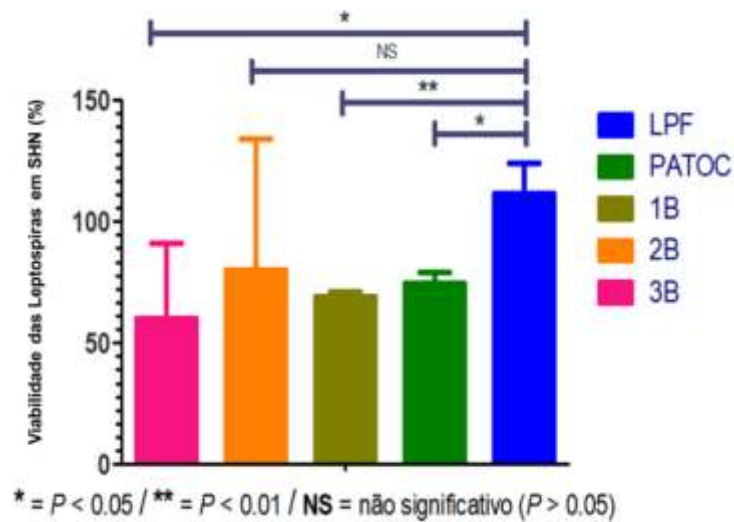


Gráfico 1 – Viabilidade celular das estirpes transconjugantes *L. biflexa*/LIC13322 no soro humano normal. A sobrevivência das estirpes foi normalizada a partir da sobrevivência frente ao soro normal humano inativado, considerado como 100 %. As triplicatas foram analisadas utilizando 2way ANOVA.

5. DISCUSSÃO

A secreção de proteases e toxinas é vantajosa para os patógenos por conferir o controle do microambiente no hospedeiro infectado. Nos últimos anos, nosso grupo vem explorando o potencial de ação de proteínas secretadas por leptospiras. Hoje, sabemos que proteases presentes no sobrenadante de cultura de estirpes patogênicas são capazes de degradar diversas moléculas do hospedeiro incluindo proteínas da matriz extracelular, da cascata de coagulação e do sistema complemento (FRAGA et al., 2014a; ESHGHI et al., 2015; AMAMURA et al., 2017; PICARDEAU, 2017; GHAZAEI, 2018; WUNDER; ESHGHI; BENAROUDJ, 2018; PASSALIA et al., 2020). Portanto, a bactéria secreta proteínas que contribuem para os processos de invasão e evasão imune. As proteases microbianas normalmente possuem um papel no ciclo de vida dos organismos, mas certas enzimas produzidas por microrganismos patogênicos também podem ocasionalmente agir como toxinas no hospedeiro.

Nesse projeto realizamos a caracterização funcional de quatro termolisinas presentes nas espécies patogênicas de *Leptospira* (metaloproteases codificadas pelas LICs 13320, 13321, 13322 e 10715). Para isso os quatro genes foram clonados e as proteínas recombinantes expressas e purificadas. A capacidade de degradar componentes da matriz extracelular e moléculas do sistema complemento é característica exclusiva de estirpes patogênicas de *Leptospira*. Estirpes saprófitas não possuem qualquer atividade proteolítica sobre a gama de componentes até então testada. Em estudos anteriores do grupo, demonstrou-se que a LIC13322 possui a capacidade de hidrolisar os componentes C3 e C6 do sistema complemento (FRAGA et al., 2014b; AMAMURA et al., 2017). Uma caracterização funcional mais ampla, envolvendo uma gama de substratos e as demais termolisinas, foi alvo de análise no presente projeto.

Um dos fatos interessantes observados foi a clivagem de C6 exclusivamente pela LIC13322, mostrando que há um certo grau de especificidade por certos substratos de acordo com a proteína. A LIC10715, que mais difere das demais e cujo gene está localizado em outro local do genoma, não foi capaz de clivar nenhuma das proteínas do sistema complemento testadas, o que também indica que as termolisinas apresentam diferenças quanto à predileção por substratos provavelmente por divergências nas sequências de aminoácidos que flanqueiam o sítio catalítico.

As termolisinas LIC13320 e LIC13321 apresentaram atividade proteolítica sobre C3 e C7, com degradação completa de C7 em ambos os casos e da cadeia α de C3 pela LIC13321. A LIC13320 degradou parcialmente a cadeia α de C3, porém esta degradação gerou um número expressivo de fragmentos. Além destes substratos a LIC13321 também foi capaz de degradar o componente C5, assim como a LIC13322, com o desaparecimento total da cadeia α .

A LIC13322, que já havia sido alvo de estudos em nosso grupo (FRAGA et al., 2014b; FRAGA; ISAAC; BARBOSA, 2016; AMAMURA et al., 2017; CHURA-CHAMBI et al., 2018) foi a termolisina que apresentou, juntamente com a LIC13321, o maior espectro proteolítico sobre as moléculas do sistema complemento humano, sendo capaz de clivar C3, C5 e C6. Curiosamente, três das quatro termolisinas hidrolisaram C3, principal alvo dessa classe de metaloproteases de leptospiros, mas nenhuma delas foi capaz de degradar C3b. No entanto, vale lembrar que leptospiros patogênicos possuem outras estratégias de evasão ao ataque lítico mediado pelo sistema complemento, como por exemplo, a aquisição de reguladores negativos desta cascata em sua superfície (MERI et al., 2005; BARBOSA et al., 2009). A interação dessas espiroquetas com os reguladores Fator H e C4b Binding Protein leva à inativação tanto de C3b quanto de C4b e, dessa forma, a cascata do complemento não progride para a via terminal de ativação, poupando as bactérias da lise mediada pelo complexo de ataque à membrana (MAC).

De qualquer forma, a inativação de C3 e de C5 observada deve gerar um impacto funcional, uma vez que C3 é essencial para a formação das C3/C5 convertases e C5, uma vez clivado pelas C5 convertases, gera C5b que representa o início da formação do poro lítico (Figura 7).

Embora dados anteriores do grupo tenham mostrado que leptospiros patogênicos secretam proteases que alvejam o fibrinogênio, degradando as cadeias α e β desta molécula da cascata de coagulação (DA SILVA et al., 2018), este fenômeno não pôde ser atribuído às termolisinas. De acordo com nossos achados, nenhuma das quatro LICs aqui testadas foi capaz de degradar este substrato. Resultados recentes do grupo, ainda não publicados, apontam para o envolvimento de outras metaloproteases secretadas por leptospiros na inativação do fibrinogênio.

No que diz respeito a proteoglicanas, que também são alvo de proteases de leptospiros patogênicos (DA SILVA et al., 2018), uma degradação parcial da molécula de decorina foi observada na presença das LIC13321 e LIC13322. Além de seu papel estrutural,

importante para a formação e manutenção das fibrilas de colágeno I e II na matriz intersticial (BIANCO et al., 1990), a decorina participa de uma gama de processos incluindo a regulação de TGF- β 1 (TAKEUCHI; KODAMA; MATSUMOTO, 1994). O impacto funcional da degradação de proteoglicanas por proteases de *Leptospira* ainda precisa ser melhor investigado.

Realizamos também a expressão heteróloga do gene que codifica a LIC13322 em uma estirpe não-patogênica de *Leptospira* (Patoc). Essa estratégia representou uma alternativa à impossibilidade de se realizar o *knockout* simultâneo das quatro termolisinas presentes nas espécies patogênicas de *Leptospira*. Ensaio de susceptibilidade ao soro humano com a estirpe Patoc/LIC13322 mostraram que esta termolisina não foi capaz de conferir resistência à atividade bactericida do soro. Embora preliminar, esse dado aponta para um papel aditivo e complementar dessas proteases no que tange à evasão ao sistema complemento. Ainda, dados do grupo, ainda não publicados, atestam a participação de outras metaloproteases secretadas para o meio extracelular no processo de escape à lise mediada pelo complemento. Portanto, diante do exposto, é possível que a sobrevivência de leptospiros patogênicos no soro ativo resulte da ação de múltiplas proteases que alvejam diferentes componentes da cascata do complemento. É importante salientar também que a secreção de proteases é um dos mecanismos apresentados por leptospiros patogênicos para escapar da ação do sistema complemento. A aquisição de reguladores negativos das vias alternativa (Fator H), clássica e das lectinas (C4BP) e terminal (vitronectina) por proteínas de membrana da bactéria, assim como o recrutamento de plasminogênio, que se transforma em plasmina e indiretamente também degrada moléculas do complemento, são estratégias que se somam à secreção de proteases para garantir o potencial invasor dessas espiroquetas (Meri et al., 2005; Barbosa et al., 2009; da Silva et al., 2015; Castiblanco-Valencia et al., 2016; Barbosa & Isaac, 2020).

6. CONCLUSÕES

Em suma, os dados gerados neste trabalho indicam que as termolisinas LIC13320, LIC13321 e LIC13322 possuem atividade proteolítica contra uma série de substratos, agindo principalmente sobre proteínas do sistema complemento humano, importante linha de defesa do nosso sistema imune inato. É possível que tais proteases, exclusivamente presentes em espécies patogênicas de *Leptospira*, tenham um papel aditivo e complementar, contribuindo para a disseminação dessas bactérias no hospedeiro. A inibição do sistema complemento na circulação poderia propiciar um ambiente favorável a multiplicação e disseminação dessas bactérias durante a infecção. Essa hipótese poderá ser comprovada mediante a obtenção de cepas patogênicas de *Leptospira* que tenham os quatro genes que codificam as termolisinas inativados (*knock-out* múltiplo).

7. REFERÊNCIAS

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 27 jan. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113509001163>>. Acesso em: 2 maio. 2018.

AHMED, N. et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, p. 1–10, 2006.

AMAMURA, T. A. et al. Pathogenic *Leptospira* secreted proteases target the membrane attack complex: A potential role for thermolysin in complement inhibition. **Frontiers in Microbiology**, 2017.

ATZINGEN, M. V. et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 1–16, 2008.

BARBOSA, A. S. et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6356–6364, 2006.

BARBOSA, A. S. et al. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p. 1137–1143, mar. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19114549/>>. Acesso em: 30 dez. 2020.

BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Strategies used by *Leptospira* spirochetes to evade the host complement system. **FEBS Letters**, v. 594, n. 16, p. 2633–2644, 2020.

BARRAGAN, V. et al. **Critical knowledge gaps in our understanding of environmental cycling and transmission of *Leptospira* spp.** **Applied and Environmental Microbiology** American Society for Microbiology, , 2017. .

BARRAGAN, V. A. et al. Interactions of *Leptospira* with environmental bacteria from surface water. **Current Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1802–1806, jun. 2011.

BIANCO, P. et al. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and

decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1549–1563, 1990. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2212616/>>. Acesso em: 30 dez. 2020.

BRASIL. Leptospirose: Situação epidemiológica do Brasil no período de 2007 a 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n. August 2019, p. 7, 2018.

CHUNG, M.-C. et al. Secreted Neutral Metalloproteases of Bacillus anthracis as Candidate Pathogenic Factors *. 2006. Disponível em: <<http://www.jbc.org/>>. Acesso em: 28 set. 2018.

CHURA-CHAMBI, R. M. et al. Leptospira interrogans thermolysin refolded at high pressure and alkaline pH displays proteolytic activity against complement C3. **Biotechnology Reports**, p. e00266, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00266>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

DA SILVA, L. B. et al. Leptospira interrogans secreted proteases degrade extracellular matrix and plasma proteins from the host. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. MAR, 27 mar. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29637048/>>. Acesso em: 30 dez. 2020.

DE KREIJ, A.; VENEMA, G.; VAN DEN BURG, B. Substrate Specificity in the Highly Heterogeneous M4 Peptidase Family Is Determined by a Small Subset of Amino Acids*. 2000. Disponível em: <<http://www.jbc.org/>>. Acesso em: 28 set. 2018.

ESHGHI, A. et al. Pathogenic Leptospira interrogans exoproteins are primarily involved in heterotrophic processes. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 8, p. 3061–3073, 2015.

FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. [s.l.] CRC Press Inc., 1994.

FRAGA, T. R. et al. Immune evasion by pathogenic Leptospira strains: The secretion of proteases that directly cleave complement proteins. **Journal of Infectious Diseases**, 2014a.

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

FRAGA, T. R.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S. **Complement evasion by pathogenic Leptospira***Frontiers in Immunology*, 2016. .

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 2010.

GHAZAEI, C. Pathogenic *Leptospira* : Advances in understanding the molecular pathogenesis and virulence. v. 8, p. 13–24, 2018.

HOUSTON, S. et al. Activation and proteolytic activity of the treponema pallidum metalloprotease, pallilysin. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 7, p. 17, jul. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22910436/>>. Acesso em: 30 dez. 2020.

ITURRY-YAMAMOTO, G.; PORTINHO, C. **SISTEMA COMPLEMENTO: ATIVAÇÃO, AÇÃO, E DEFICIÊNCIAS CONGÊNITAS E ADQUIRIDAS***Rev Ass Med Brasil*. [s.l: s.n.].

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

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. **Leptospira: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen***Nature Reviews Microbiology*, 2009. .

LEVETT, P. N. Leptospirosis. v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.

LIN, Y. P. et al. Repeated domains of *Leptospira* immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 29, p. 19380–19391, 2009.

MELO, T. F.; PECONICK, A. P. As características da *Leptospira* spp.: uma revisão de literatura. *Scire Salutis*, v. 9, n. 3, p. 1–7, 2019.

MERI, T. et al. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. *Microbial Pathogenesis*, v. 39, n. 4, p. 139–147, out. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16169184/>>. Acesso em: 30 dez. 2020.

MOSESSON, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8, **Anais...**2005.

MOUW, J. K.; OU, G.; WEAVER, V. M. Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 771–785, 2014.

MURRAY, G. L. The molecular basis of leptospiral pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 139–185, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-45059-8_7>. Acesso em: 30 dez. 2020.

PARK, S. Y. et al. Immune Evasion of *Enterococcus faecalis* by an Extracellular Gelatinase That Cleaves C3 and iC3b . **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 6328–6336, 2008.

PASSALIA, F. J. et al. *Leptospira interrogans* Bat proteins impair host hemostasis by fibrinogen cleavage and platelet aggregation inhibition. **Medical Microbiology and Immunology**, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00430-020-00664-4>>. Acesso em: 26 fev. 2020.

PICARDEAU, M. **Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita?** **Nature Reviews Microbiology**, 2017. .

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

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

TAKEUCHI, Y.; KODAMA, Y.; MATSUMOTO, T. Bone matrix decorin binds transforming growth factor- β and enhances its bioactivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 51, p. 32634–32638, 1994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7798269/>>. Acesso em: 30 dez. 2020.

VERNEL-PAUILLAC, F.; WERTS, C. Recent findings related to immune responses against leptospirosis and novel strategies to prevent infection. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 9–10, p. 578–588, 2018.

VIEIRA, A. S.; PINTO, P. S.; LILENBAUM, W. A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, n. 2, p. 229–

238, 1 fev. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11250-017-1429-y>>. Acesso em: 2 maio. 2018.

VINCENT, A. T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, 2019.

WEISEL, J. W. Fibrinogen and fibrin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 70, p. 247–299, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15837518/>>. Acesso em: 4 dez. 2020.

WOLBACH, S. B.; BINGER, C. A. Notes on a filterable Spirochete from fresh Water. *Spirocheta biflexa* (new Species). **The Journal of medical research**, v. 30, n. 1, p. 23-26.1, 1914. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19972157>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2094401>>.

WUNDER, E. A.; ESHGHI, A.; BENAROUDJ, N. Editorial: Pathogenesis of *Leptospira*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology | www.frontiersin.org**, v. 1, p. 322, 2018. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 24 out. 2018.

XUE, F.; YAN, J.; PICARDEAU, M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 3, p. 328–333, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2008.12.007>>.

ANEXO A - Lista de soluções utilizadas

- Preparação de bactérias competentes (soluções esterilizadas por filtração e armazenadas a 4°C):
 - **Solução RF:** Cloreto de Magnésio 1M
 - **Solução RF I:** acetato de potássio 30mM, cloreto de potássio 100mM, Cloreto de manganês 50mM, cloreto de cálcio 10mM, glicol 15% - pH 5,8
 - **Solução RF II:** cloreto de potássio 10mM, Cloreto de cálcio 75mM, Na-MOPS 10mM, glicerol 15% - pH 6,8

- Gel de SDS-PAGE
 - **Acrilamida 30%:** Acrilamida 29% + Bis - Acrilamida 1%
 - **Tampão Tris-HCl pH 8,8:** Tris HCl 1,5 M, SDS 0,1%
 - **Tampão Tris-HCl pH 6,8:** Tris HCl 1 M, SDS 0,1%
 - **APS:** Persulfato de Amônio 10%
 - **TEMED:** N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina

- Corrida SDS-PAGE
 - **Tampão de aplicação 5x:** Tris-HCl 50 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, -mercaptoetanol 100 mM e SDS 2%
 - **Tampão de corrida:** Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3

- Coloração por Coomassie Blue
 - **Solução corante coomassie:** Coomassie blue 0,025%, ácido acético glacial 10%, Etanol absoluto 45% e água ultrapura 45%
 - **Solução Descorante:** Ácido Acético Glacial 10%, Etanol 30%

- Coloração por prata
 - **Solução fixadora:** Etanol 50%, ácido acético glacial 12%, formaldeído 0,05%
 - **Solução Álcool:** Etanol 30%
 - **Solução tiosulfato de sódio:** Tiosulfato de sódio 0,02%
 - **Solução corante:** Nitrato de Prata 0,1%, Formaldeído 0,075%
 - **Solução reveladora:** Carbonato de sódio 2%, formaldeído 0,05%
 - **Solução STOP:** Etanol 50%, ácido acético glacial 12%

- Western - Blot

- **Tampão de transferência:** Tris - base 48 mM, Glicina 39mM, Etanol 20%, SDS 0,037% - pH 8,3
- **PBS:** Cloreto de Sódio 1,37 M, Cloreto de Potássio 0.027 M, Fosfato dissódico 0,10 M, Fosfato Monopotássico 0,017 M - pH 7,4
- **PBS-T:** PBS, Tween 20 0,05%
- **Tampão de bloqueio:** PBS-T, leite desnatado em pó 10%
- **Solução de diluição dos anticorpos:** PBS-T, Leite desnatado em pó 5%

- Eletroforese em gel de agarose

- **TAE 1x:** Tris-Acetato 40 mM 1mM EDTA