

ADRIANA ROCÍO CÁRDENAS ARIAS

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE *LEPTOSPIRA*
QUE INTERAGEM COM MOLÉCULAS DA MATRIZ EXTRACELULAR
E REGULADORES DO SISTEMA COMPLEMENTO DO HOSPEDEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2018

ADRIANA ROCÍO CÁRDENAS ARIAS

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE *LEPTOSPIRA*
QUE INTERAGEM COM MOLÉCULAS DA MATRIZ EXTRACELULAR E
REGULADORES DO SISTEMA COMPLEMENTO DO HOSPEDEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Ângela Silva Barbosa

Versão original

São Paulo

2018.

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

Cárdenas Arias, Adriana Rocío.

Identificação de proteínas de membrana de *Leptospira* que interagem com moléculas da matriz extracelular e reguladores do sistema complemento do hospedeiro/ Adriana Rocío Cárdenas Arias; Dra. Ângela Silva Barbosa. --São Paulo, 2018.

nº de páginas 111

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

1. *Leptospira*. 2. Proteínas da membrana externa. 3. Interação. 4. Moléculas matriz extracelular 5. Fator H. I. Barbosa, Ângela Silva. III. Identificação de proteínas de membrana de *Leptospira* que interagem com moléculas da matriz extracelular e reguladores do sistema complemento do hospedeiro

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

Candidata: Adriana Rocío Cárdenas Arias

Título da Tese: Identificação de proteínas de membrana de *Leptospira* que interagem com moléculas da matriz extracelular e reguladores do sistema complemento do hospedeiro

Orientadora : Profa. Dra. Angela Silva Barbosa

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

() **Aprovada**

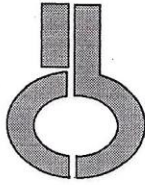
() **Reprovada**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:.....
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:.....
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:.....
Instituição:

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 670/14 referente ao projeto intitulado: "*Identificação de proteínas de membrana de leptospira que interagem com moléculas da matriz extracelular e reguladores do sistema complemento do hospedeiro*" sob a responsabilidade de **Adriana Rocio Cárdenas Arias**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 25 de junho de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

À meus amados pais, Luz Marleny, minha mãe e melhor amiga e Julio, “mi papito lindo”, que desde Colômbia me deram apoio e amor incondicional e sempre acreditaram em mim e a meu amado companheiro de vida, Eduardo, meu amor, meu amigo, meu suporte, meu médico, meu enfermeiro, meu ‘pañó de lagrimas’ ,meu esposo, este trabalho e também graças a você

AGRADECIMENTOS

A realização deste Doutorado foi um sonho anelado e conquistado, e neste caminho não estive sozinha, fui abençoada com anjos e pessoas com enorme conhecimento que tornaram este trabalho possível.

Com muito carinho agradeço:

A minha orientadora, Dra. Ângela Silva Barbosa, que me acolheu em seu laboratório. Você é um exemplo de cientista, comprometida e dedicada que me ensinou que além de ser uma cientista brilhante, paciente, engajada, com conhecimentos, pode ser também mãe e esposa. Muito obrigada!

Dra. Patrícia A. E. Abreu de Aniz, pelos conselhos e apoio.

A *Aline (gatinha)*, pela amizade, companhia, e paciência para corrigir meu “*portonhol*”

A minha querida amiga Marcia, obrigada pelos seus conselhos, amizade e seu amor.

Às minhas amigas e demais companheiras de laboratório Gabriela, Matilde, Denisse, Dani, Priscila, Julia, sou privilegiada por estar na companhia de pessoas de bem

A os demais colegas de outros laboratórios que me auxiliaram nesse crescimento profissional e pessoal, em especial a Roberto, Fernando, Paulo, Fernanda, Abraham, Bruna, Bruno e muitos outros

Meus sinceros agradecimentos aos colaboradores deste projeto:

Dra. Martha Sonobe pela colaboração no isolamento das OPMs

Dr. Leo Iwai pelos ensaios de espectrometria de massas

Dra. Daniela Luz por me auxiliar na produção de algumas das proteínas

À Dra. Rosa Chura Chambi, por me auxiliar na produção de uma das proteínas e obrigada por me ensinar com um sorriso tantas coisas.

A secretaria do departamento de pós-graduação em Microbiologia, Gisele, sem você o departamento não seria tão organizado, obrigada pelas dicas, carinho, sorrisos e amizade

Ao professor Nilton, por estar ali quando eu precisei

À Dra. Roxane Maria F. Piazza, Dr, a Dra Ligia Morganti e o Dr Waldir Pereira Elias Jr do Instituto Butantan, que abriram as portas e me permitiram utilizar as dependências e equipamentos de seus laboratórios, obrigada.

Ao Professor Ben Luisi e sua família por ter aberto um lugar em Cambridge e fazer dessa viagem um aprendizado maravilhoso

As professoras Marilis, Andrea, Rita, e aos professores Wellington, Gabriel e demais professores e funcionários do Programa de pós graduação em microbiologia da USP, por todo o ensinamento e trabalho prestado, sou muito grata.

Aos demais pesquisadores, estudantes e funcionários do Instituto Butantã que tornaram a convivência diária um grande aprendizado.

Ao instituto Butantã por permitir-me realizar meu Doutorado nas suas dependências

O presente trabalho foi realizado com apoio:

Da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)
- Código de Financiamento 001.

Da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)
Projeto nº AUXPE – PROEX 1667/2018 – Processo nº 23038.015071/2018-12

Com o auxílio de bolsa PROEX de doutorado número 1418944

E da FAPESP : Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

*True happiness is to enjoy the present, without anxious dependence upon the future,
not to amuse ourselves with either hopes or fears but to rest satisfied with what we
have, which is sufficient, for he that is so wants nothing.*

Seneca

RESUMO

CARDENAS-ARIAS, A. R. **Identificação de proteínas de membrana de *Leptospira* que interagem com moléculas da matriz extracelular e reguladores do sistema complemento do hospedeiro.** 2018. 111 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A leptospirose é causada por espécies patogênicas da espiroqueta *Leptospira*. É uma das zoonoses mais disseminadas em todo o mundo, representando um grande problema de saúde pública em países tropicais subdesenvolvidos. No processo de infecção, leptospirosas patogênicas, quando presentes em grande número, são capazes de sobreviver, se multiplicar e desencadear uma resposta imune específica. Isto se deve à capacidade que apresentam de aderir a células eucariotas e a proteínas da matriz extracelular e à habilidade de escapar aos mecanismos de defesa inata do hospedeiro.

O principal objetivo deste trabalho foi identificar proteínas de membrana externa de *Leptospira* capazes de interagir com moléculas do hospedeiro. Proteínas de membrana externa (OMPs) da bactéria foram obtidas e incubadas com proteínas da matriz extracelular, da cascata de coagulação e com o regulador negativo do sistema complemento Fator H, pré-imobilizados em esferas magnéticas. Os ligantes foram identificados por espectrometria de massas. Uma série de proteínas foi identificada, algumas já descritas como supostas adesinas e outras com função ainda desconhecida. Do total de proteínas obtidas, cinco (LIC20001, LIC11003 ou LruA /LipL71, LIC12966 ou LipL41, LIC12901 e LIC13322) foram selecionadas e produzidas em sistema heterólogo em *Escherichia coli*. A seleção dessas proteínas baseou-se na presença de domínios relacionados à adesão e na ocorrência apenas em espécies patogênicas de *Leptospira*.

A interação com componentes específicos do hospedeiro foi validada por ensaios de Far - *Western blot*. À exceção da LipL41, todas as demais proteínas tiveram suas interações confirmadas por esta técnica. Duas das cinco proteínas (LIC20001 e LIC13322) foram melhor caracterizadas, e os dados mostraram que o domínio discoidina da LIC20001 é o responsável pela interação com fibrinogênio, fibronectina, laminina e vários tipos de colágeno. A localização na superfície da

bactéria foi experimentalmente confirmada por microscopia eletrônica e a proteína foi capaz de inibir, ainda que marginalmente, a interação da bactéria a alguns dos componentes testados. A outra proteína, LIC13322, é uma metaloprotease que vem sendo estudada pelo grupo, capaz de se ligar e clivar moléculas da cascata do complemento. Neste trabalho, demonstrou-se que LIC13322 liga-se à vitronectina, nos domínios de interação com heparina e, aparentemente, forças iônicas estão envolvidas nesta interação.

A caracterização funcional destas proteínas, assim como a identificação das moléculas-alvo do hospedeiro com as quais essas proteínas são capazes de interagir, podem contribuir para a compreensão dos mecanismos de invasão, disseminação e evasão imune utilizados por leptospiros patogênicos.

Palavras-chave *Leptospira*. Proteínas da membrana externa. Interação. Fibronectina. Fibrinogênio. Laminina. Vitronectina. Fator H.

ABSTRACT

CARDENAS-ARIAS, A. R. **Identification of Leptospiral membrane proteins interacting with extracellular matrix molecules and host complement system regulators.** 2018. 111 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Leptospirosis is caused by pathogenic species of the spirochete *Leptospira*. It is one of the most widespread zoonoses worldwide and represents a major public health problem in tropical and developing countries. During the infection process, pathogenic leptospire are able to survive, multiply and trigger a specific immune response if they are present in a large number. This is attributed to their ability to adhere to eukaryotic cells and extracellular matrix proteins and the ability to escape the mechanisms of innate host defense.

The main objective of this work was to identify outer membrane proteins of *Leptospira* capable of interacting with host molecules. Outer membrane proteins (OMPs) from the bacterium were obtained, and incubated with proteins from the extracellular matrix, the coagulation cascade and the negative complement regulator Factor H, pre-immobilized on magnetic beads. Ligands were identified by mass spectrometry. A variety of proteins have been identified, some already described as putative adhesins and others with still unknown function. Of the total proteins obtained, five (LIC20001, LIC11003 or LruA / LipL71, LIC12966 or LipL41, LIC12901 and LIC13322) were selected and produced in a heterologous system in *Escherichia coli*. The selection of these proteins was based on the presence of domains related to adhesion and on the occurrence only in pathogenic species of *Leptospira*.

Interaction with specific host components was validated by Far - Western blot assays. Excluding LipL41, all other proteins had their interactions confirmed by this technique. Two of the five proteins (LIC20001 and LIC13322) were better characterized, and the data showed that the discoidin domain of LIC20001 is responsible for the interaction with fibrinogen, fibronectin, laminin and various types of collagen. Surface localization of LIC20001 was experimentally confirmed by electron microscopy and the protein was able to inhibit, albeit marginally, the interaction of the bacteria with some of the components tested. The other protein, LIC13322, is a metalloprotease that has been studied by the group, capable of binding and cleaving

molecules of the complement cascade. In this work, LIC13322 has been shown to bind to the heparin domains of vitronectin, and apparently ionic forces are involved in this interaction.

The functional characterization of these proteins, as well as the identification of target host molecules with which these proteins are capable of interacting, may contribute to understanding the mechanisms of invasion, dissemination and immune evasion used by pathogenic leptospires.

Key words: *Leptospira*. Outer membrane proteins. Interaction. Fibronectin. Fibrinogen. Laminin. Vitronectin. Factor H.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espécies de <i>Leptospira</i> agrupadas em três clados	26
Figura 2 – Diagrama longitudinal de uma espiroqueta típica.....	27
Figura 3 – Tomografia crio-eletrônica da membrana de <i>Leptospira</i>	29
Figura 4 – Representação esquemática da arquitetura da membrana de leptospira.	29
Figura 5 – Representação esquemática da laminina.....	33
Figura 6 – Modelo esquemático dos domínios da molécula vitronectina.....	36
Figura 7 – Representação esquemática da fibronectina.	37
Figura 8 – Estrutura cristalográfica do fibrinogênio.	38
Figura 9 – Inativação da via alternativa do complemento por <i>Leptospira</i> patogênica pela interação com Fator H.	39
Figura 10 – OMPs obtidas por biotinilação ou extração com sarcosil.	65
Figura 11 – Ensaio piloto de <i>Far-Western blot</i>	66
Figura 12 – OMPs que interagiram com diferentes moléculas do hospedeiro coradas por prata.....	67
Figura 13 – Fragmentos amplificados por PCR.....	69
Figura 14 – Clonagem dos genes de interesse.	71
Figura 15 – Análise das frações coletadas durante a purificação da proteína LIC20001 (fragmento maior) a partir do extrato solúvel.....	73
Figura 16 – Análise das frações coletadas durante a purificação do fragmento menor da proteína LIC20001 a partir do extrato insolúvel.....	74
Figura 17 – Análise das frações coletadas durante a purificação da proteína LruA e o do fragmento LysM a partir do extrato solúvel.....	75

Figura 18 – Análise do domínio LRR do Regulador metabólico molibdato purificado e dialisado.	77
Figura 19 – Análise das frações coletadas durante a purificação da proteína LipL41 a partir do extrato solúvel.	78
Figura 20 – Proteínas purificadas e concentradas.	79
Figura 21 – Curvas de titulação de anticorpos produzidos contra as proteínas recombinantes.	80
Figura 22 – Localização celular da proteína com domínio discoidina (LIC20001).	80
Figura 23 – Localização celular da proteína com domínio LRR (LIC12901).	83
Figura 24 – Análise da interação de fibronectina plasmática, laminina, colágeno I, fibrinogênio, vitronectina e FH com as proteínas em estudo por Western blot com sobreposição.	85
Figura 25 – Interação entre LIC20001 (domínio discoidina) e diferentes tipos de colágeno.	88
Figura 26 – Adesão da bactéria <i>Leptospira</i> aos componentes da matriz extracelular colágeno IV, laminina, fibronectina e fibrinogênio na presença da proteína LIC20001 (domínio discoidina)	89
Figura 27 – Interação da termolisina com vitronectina.	90
Figura 28 – Mapeamento dos sítios de interação termolisina/vitronectina.	91
Figura 29 – Papel das forças iônicas na interação termolisina/vitronectina.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades das cepas de <i>E. coli</i> utilizadas.....	44
Tabela 2 – Descrição dos vetores empregados neste trabalho	50
Tabela 3 – Oligonucleotídeos, tamanho dos fragmentos amplificados e massa molecular predita das proteínas recombinantes.....	51
Tabela 4 – Proteínas selecionadas para o estudo.	68
Tabela 5 – Resumo dos resultados dos ensaios de interação das proteínas em estudo com componentes do hospedeiro.	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN -	Acetonitrila
AF -	Ácido fórmico
AMP -	Ampicilina
AMP ^R -	Gene de resistência a ampicilina
Abs. -	Absorbância
BLAST -	<i>Basic local alignment search tool</i>
BSA -	Albumina sérica bovina
CFU -	Unidade de formação de colônias
C4BP -	<i>C4b Binding Protein</i>
DTT -	Ditiotreitol
dNTPs -	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
Efb -	Extra-cellular fibrinogen-binding protein
ELISA -	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMJH -	Ellinghausen McCullough Johnson Harris
FH -	Fator H
FliY -	<i>Flagellar motor switch protein</i>
FlaA2 -	<i>Flagelar filament outer layer protein</i>
His -	Histidina
IAA -	Iodoacetamida
I.D. -	<i>Inner diameter</i>
IgG -	Imunoglobulina G
IPTG -	Isopropil-B-D-tiogalactopiranosídeo
Kbar -	Unidade de pressão
kDa -	KiloDalton
Km50 -	Canamicina 50 µg/mL
kV -	Kilovolt
L -	Litro
LB -	Meio Luria-Bertani
LcpA -	<i>Leptospiral complement regulator-acquiring protein A</i>
Lig -	<i>Leptospiral immunoglobulin-like proteins</i>
LigAC -	<i>Leptospiral immunoglobulin-like protein AC</i>

LPS –	Lipopolissacarídeo
Lsp -	Lipoproteína sinal peptidase
Lnt -	Lipoproteína N-acil transferase
M -	Molar
MET -	Microscopia Eletrônica de Transmissão
min –	Minutos
mg -	Miligrama
mL -	Mililitro
mM -	Milimolar
MM -	<i>Mass Spectrometry</i>
<i>m/z</i> -	Relação massa-carga
ng –	Nanograma
nm -	Nanômetros
°C –	Graus Celsius
pb –	Pares de bases
pb/μL -	Pares de bases por microlitro
pH -	Potencial de Hidrogênio
O.D. -	<i>Outer diameter</i>
OMP	<i>Outer membrane protein</i> (proteína de matriz extracelular)
OPD -	<i>o</i> -dihidroclorato de fenilenodiamina
PBS -	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-T-	<i>Phosphate buffered saline Tween-20</i>
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
SCR -	<i>Short Consensus Repeats</i>
SDS-PAGE -	Eletroforese em gel de Poliacrilamida contendo SDS
SHN -	Soro Humano Normal
rpm -	Rotação por minuto
Tris -	Hidroximetilaminometano
X-GAL -	5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo
x g -	Força centrífuga relativa
U/μL -	Unidades por microlitro
μm -	Micrômetro

μg - Micrograma

μL - Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
1.1	A BACTÉRIA LEPTOSPIRA	26
1.2	LEPTOSPIROSE	30
1.3	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	30
1.4	MOLÉCULAS-ALVO DO HOSPEDEIRO: COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR E REGULADORES DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	33
1.4.1	Laminina	33
1.4.2	Vitronectina.....	34
1.4.3	Fibronectina	36
1.4.4	Fibrinogênio.....	37
1.4.5	Fator H.....	39
2	OBJETIVO	41
2.1	Etapas do trabalho	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	Soluções e reagentes.....	42
	Meios de cultura para bactérias.....	43
3.2	CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	44
3.3	BIOTINILAÇÃO E ISOLAMENTO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DE <i>LEPTOSPIRA</i>	45
3.3.1	Extração das OMPs com o detergente sarcosil.....	45
3.4	INTERAÇÃO DAS OMPs COM MOLÉCULAS DO HOSPEDEIRO POR <i>OVERLAY</i>	46

3.5	ISOLAMENTO DE LIGANTES DE LAMININA, FIBRONECTINA, FIBRINOGENIO, FATOR H E VITRONECTINA PRÉ-IMOBILIZADOS EM ESFERAS MAGNÉTICAS.....	47
3.6	IDENTIFICAÇÃO DOS LIGANTES BACTERIANOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	47
3.7	CLONAGEM E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS SELECIONADAS	49
3.7.1	Vetores	49
3.7.2	Amplificação dos genes por PCR	51
3.7.3	Clonagem dos produtos amplificados no vetor pGEM-T e no vetor pET-28	52
3.7.4	Subclonagem dos genes no vetor de expressão pAE	52
3.7.5	Transformação na bactéria DH5 α	53
3.7.6	Seleção de clones e mini-preparação de DNA plasmidial	53
3.7.7	Sequenciamento dos plasmídios	53
3.8	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	54
3.8.1	LIC20001 (fragmento maior).....	54
3.8.2	LIC20001 (fragmento menor)	55
3.8.3	LruA/LipL71 e fragmento LysM (LIC11003).....	56
3.8.4	LIC12901 (Regulador metabólico molibdato, domínio LRR).....	57
3.8.5	LipL41 (LIC12966).....	57
3.9	CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	58
3.10	SDS-PAGE E WESTERN BLOT	58
3.11	DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS PRODUZIDOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	59

3.11.1	Produção de anticorpos contra as proteínas recombinantes LIC20001 (fragmento maior e menor), LIC11003 (LruA/LipL71), LIC12901 (regulador metabólico molibdato) e LIC12966 (LipL41)	59
3.11.2	Titulação dos soros por ELISA	59
3.12	ENSAIO DE LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS PROTEÍNAS LIC12901 (REGULADOR METABÓLICO MOLIBDATO, DOMÍNIO LRR) E LIC20001 (FRAGMENTO MAIOR)	60
3.13	INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES COM LAMININA, FIBRONECTINA, VITRONECTINA, FATOR H, FIBRINOGENO E COLÁGENO I61	
3.13.1	Por <i>overlay</i>	61
3.13.2	Avaliação da interação da proteína termolisina com vitronectina por ELISA	62
3.13.3	Avaliação do envolvimento dos domínios de heparina da vitronectina na interação com a proteína termolisina	62
3.13.4	Avaliação do papel de forças iônicas nas interações da proteína termolisina com a vitronectina humana.....	63
3.13.5	Avaliação da interação da proteína LIC20001 com diferentes tipos de colágeno por ELISA.....	63
3.14	ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ADESÃO DE LEPTOSPIRAS PELO FRAGMENTO MENOR DA PROTEINA LIC20001 (DOMÍNIO DISCOIDINA)	63
4	RESULTADOS	65
4.1	OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DE <i>LEPTOSPIRA</i>	65
4.2	INTERAÇÃO DAS OMPS COM MOLÉCULAS DO HOSPEDEIRO	65
4.3	IDENTIFICAÇÃO DOS LIGANTES BACTERIANOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E SELEÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE	67
4.4	CLONAGEM E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS SELECIONADAS	68

4.4.1	Amplificação dos genes por PCR	68
4.4.2	Clonagem dos produtos amplificados no vetor pGEM-T e no vetor pET-28	69
4.5	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	72
4.5.1	LIC20001 (fragmento maior).....	72
4.5.2	LIC20001 (fragmento menor)	73
4.5.3	LruA/LipL71 e fragmento LysM.....	74
4.5.4	Regulador metabólico molibdato, domínio LRR	76
4.5.5	LipL41	77
4.6	DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS PRODUZIDOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	79
4.7	ENSAIO DE LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS PROTEÍNAS LIC20001 E REGULADOR METABÓLICO MOLIBDATO.....	80
4.8	INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES COM LAMININA, FIBRONECTINA, VITRONECTINA, FATOR H, FIBRINOGENO E COLÁGENO	84
4.9	ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ADESÃO DE LEPTOSPIRAS A COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR PELO FRAGMENTO MENOR DA PROTEÍNA LIC20001 (DOMÍNIO DISCOIDINA).....	88
4.10	AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA TERMOLISINA COM A MOLÉCULA DE MATRIZ EXTRACELULAR VITRONECTINA POR ELISA	89
4.11	AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO À HEPARINA DA VITRONECTINA NA INTERAÇÃO COM A TERMOLISINA.	90
4.12	AVALIAÇÃO DO PAPEL DE FORÇAS IÔNICAS NAS INTERAÇÕES DA TERMOLISINA COM VITRONECTINA HUMANA	91
5	DISCUSSÃO.....	93
6	CONCLUSÕES.....	99

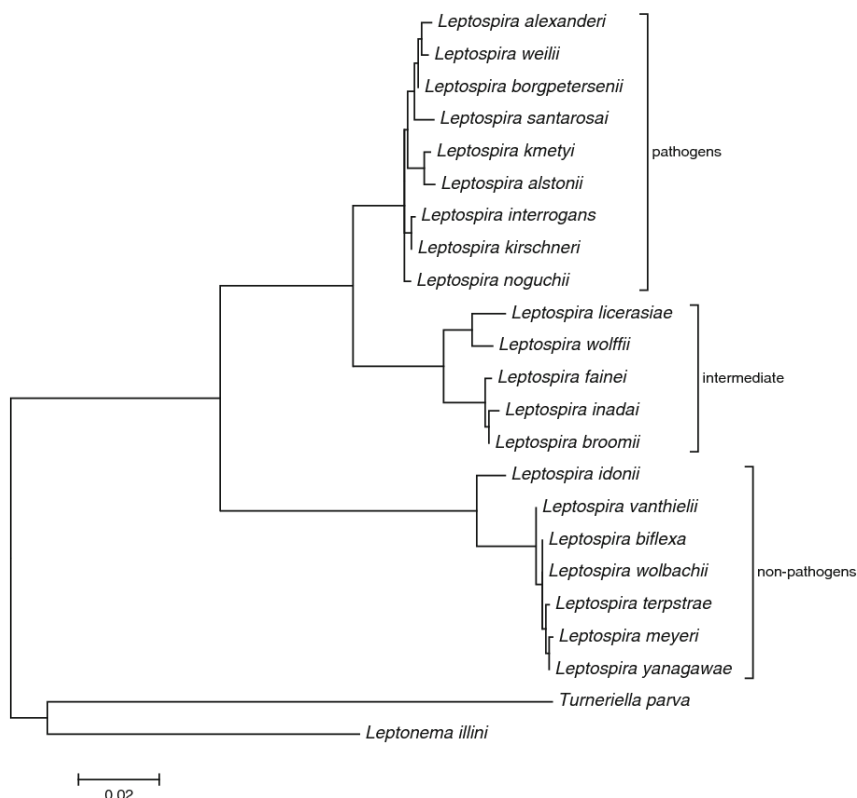
REFERÊNCIAS.....	100
Apêndice I.	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 A BACTÉRIA LEPTOSPIRA

As leptospiros são espiroquetas de aproximadamente 0,1 μm de diâmetro por 6 a 20 μm de comprimento. O gênero *Leptospira* pertence à família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales (FAINE et al., 1999). Até o momento foram descritas 21 espécies de *Leptospira* (Figura 1). O gênero inclui espécies saprófitas (de vida livre), intermediárias e patogênicas. As saprófitas podem ocasionalmente infectar animais, mas não causam a doença, uma vez que são rapidamente eliminadas da corrente sanguínea pelo sistema imune inato. As espécies intermediárias podem causar uma doença leve em animais, incluindo humanos. As espécies patogênicas são as responsáveis por infectar e causar doença (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; LEVETT, 2001).

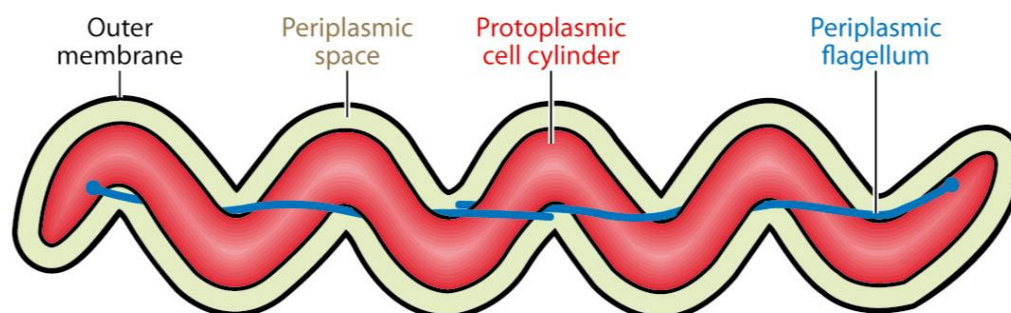
Figura 1 – Espécies de *Leptospira* agrupadas em três clados



Espécies de *Leptospira* agrupadas em três clados: Patogênicas, intermediárias e não patogênicas Fonte: Levett (2001)

Estas espiroquetas podem sobreviver em diferentes ambientes, podendo permanecer em ambientes aquáticos ou invadir e causar infecção leve, aguda e crônica em diferentes animais. Para sobreviver nos diferentes ambientes, as leptospiras possuem um sistema de motilidade conferido por dois endoflagelos ou flagelos periplasmáticos, ancorados em cada extremidade da espiroqueta e localizados entre o cilindro protoplasmático e a bainha da membrana (Figura 2) (CHARON et al., 2012; LI et al., 2000; NAKAMURA et al., 2014). Estes endoflagelos são responsáveis pela movimentação tipo saca-rolha. A *Leptospira* é caracterizada pela motilidade translacional rápida, podendo se movimentar por uma distância média de 20 µm em 2–3 segundos em meio líquido (FAINE et al., 1999). Porém a velocidade de locomoção da bactéria aumenta em condições de viscosidade, o que permite a penetração na matriz extracelular, rica em ácido hialurônico, encontrada nos tecidos (BERG; TURNER, 1979; revisado em CHARON; GOLDSTEIN, 2002).

Figura 2 – Diagrama longitudinal de uma espiroqueta típica.



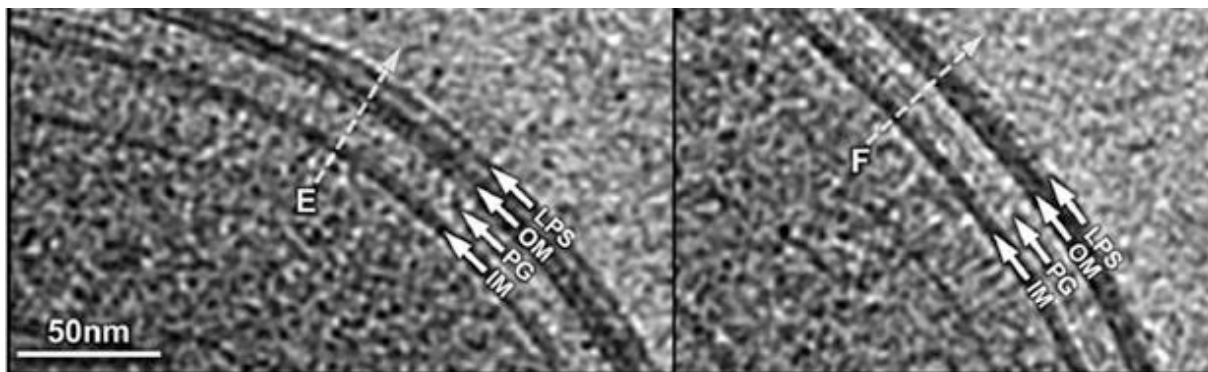
As espiroquetas possuem uma estrutura única e distinta, com flagelos periplasmáticos que se sobrepõem no centro da célula e estão ancorados em cada extremidade da bactéria. Fonte: Charon et al. (2012).

As leptospiras possuem uma estrutura típica de dupla membrana: após a membrana citoplasmática ou interna encontra-se uma camada de peptidoglicanos e logo acima está a membrana externa (Figura 3). Esta é composta principalmente de fosfolipídeos, proteínas de membrana externa (OMPs) e de lipopolissacarídeos (LPS). As membranas externas das espiroquetas contêm, pelo menos, três tipos de proteínas: lipoproteínas (que estão ancoradas a ambos os lados da membrana, através de seus lipídeos), proteínas transmembrana e OMPs periféricas (que estão

associadas à membrana externa). Proteínas transmembrana situadas nas membranas citoplasmáticas bacterianas formam α -hélices, enquanto aquelas que atravessam a membrana externa formam os chamados β -barris. As proteínas com peptídeo sinal aminoterminal, incluindo as lipoproteínas, são exportadas pelo sistema Sec. O processamento das proteínas no periplasma é realizado por três lipoproteínas que removem o peptídeo sinal e modificam o novo N-terminal: a diacilgliceriltransferase (Lgt), que liga um grupo diacil contendo dois ácidos graxos ao resíduo sulfidrilo da cisteína através de uma ligação tioéster; a lipoproteína sinal peptidase (Lsp) responsável pela remoção do péptideo sinal, de modo que a cisteína se torne o aminoácido N-terminal da lipoproteína madura e a lipoproteína N-acil transferase (Lnt), que adiciona um terceiro e último ácido graxo ao resíduo amino disponível da cisteína (HAAKE; MATSUNAGA, 2002; KOVACS-SIMON; TITBALL; MICHELL, 2011; NASCIMENTO et al., 2004).

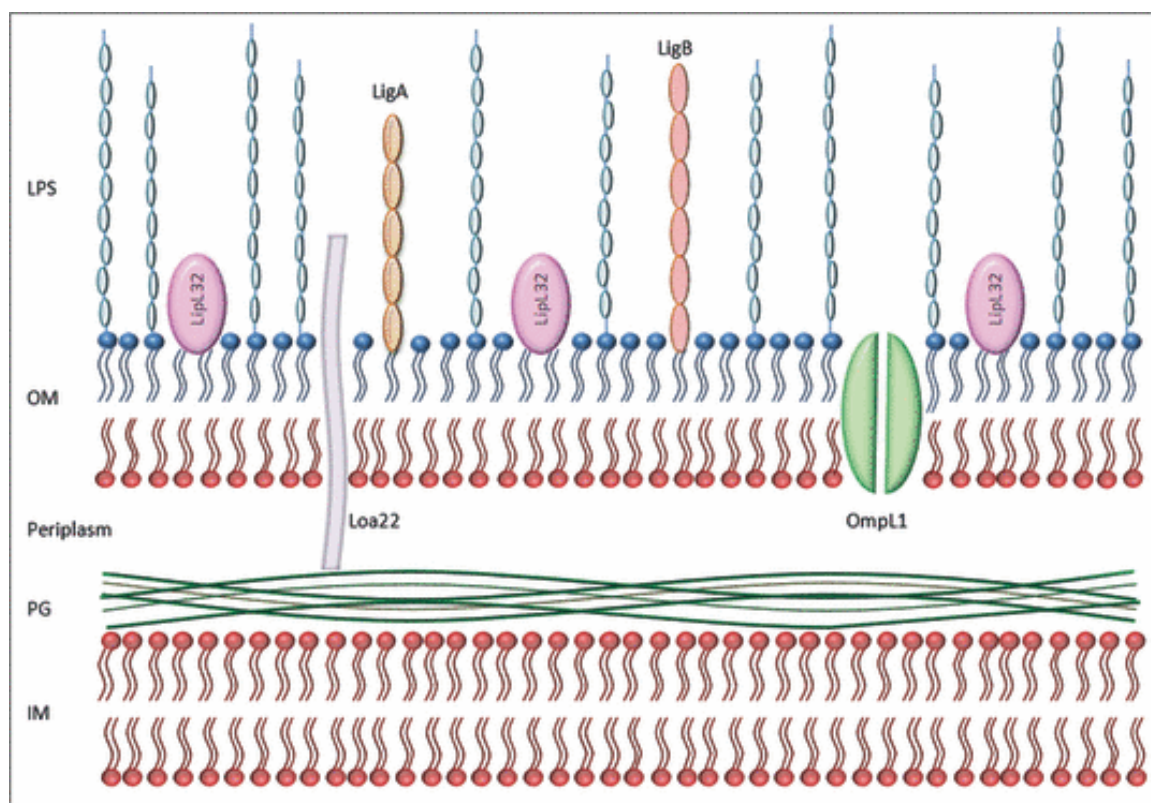
A lipoproteína pode ficar na membrana interna ou ser exportada via um homólogo de Lol até a parte interna ou externa da membrana externa, pode chegar à superfície e ficar ancorada na membrana como proteína periférica ou ser secretada para o exterior da célula (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004). Entre as principais lipoproteínas que constituem a membrana de *Leptospira* estão a LipL32, Loa22 (a segunda lipoproteína mais abundante da membrana de *Leptospira*), LipL41, as proteínas da família Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like proteins*): LigA e LigB, OmpA, FecA, CirA e OmpL1 (Figura 4). Por serem proteínas de superfície, estão em contato direto com células e componentes da matriz extracelular do hospedeiro, e são as responsáveis pelo primeiro contato com o hospedeiro, sendo algumas importantes fatores de virulência (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; BULACH; ADLER, 2018; CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004; HAAKE, 2006).

Figura 3 – Tomografia crio-eletrônica da membrana de *Leptospira*.



Tomografia crio-eletrônica de *L. interrogans* (esquerda) e *L. biflexa* (direita). Pode-se observar a membrana interna (IM), a camada de peptidoglicano (PG), a membrana externa (OM) e lipopolissacarídeo (LPS). Nota-se que a espessura da camada de LPS de *L. interrogans* é maior (9,2 nm) que da *L. biflexa* (6,0 nm). Fonte: Raddi et al. (2012).

Figura 4 – Representação esquemática da arquitetura da membrana de *Leptospira*.



Representação da membrana de *Leptospira*, onde se encontra a membrana interna (IM), associada à parede de peptidoglicanos (PG) e logo se encontra o espaço periplasmático e a membrana externa (OM). Na OM destacam-se as lipoproteínas como a Lpl32, Loa22, LenA. Fonte: Fraga, Barbosa e Isaac (2011).

1.2 LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma das zoonoses mais disseminadas em todo mundo, representando um grande problema de saúde pública. As manifestações clínicas da doença humana são diversas, variando de sintomas leves, como um quadro gripal, a formas mais graves como a síndrome de Weil. A doença grave é caracterizada por icterícia, insuficiência renal e hepática aguda, insuficiência pulmonar e hemorragia, podendo levar a óbito (FAINE et al., 1999).

A leptospirose acomete mais de 150 espécies de mamíferos, que incluem animais de estimação, rebanhos e animais selvagens. Os ratos, portadores assintomáticos, são o principal reservatório urbano da doença, uma vez que leptospirosas podem permanecer em seus túbulos renais durante anos. A infecção geralmente ocorre por contato direto com água ou solo contaminados com urina ou outros dejetos (excreções) destes roedores, como também pelo contato com sangue ou tecidos de animais infectados pela bactéria. Leptospirosas podem sobreviver por meses na água, especialmente a temperaturas entre 25°C a 30°C, sendo esta uma importante fonte de transmissão da doença (ROCA, 2006).

No Brasil a leptospirose é uma doença com maior incidência nos períodos chuvosos e se torna epidêmica nas capitais e regiões metropolitanas, principalmente por causa das condições precárias de salubridade que fazem com que os roedores proliferem (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2005). No período de 2010 a 2017, 30.553 casos foram confirmados no Brasil, dos quais 2.557 vieram a óbito. A letalidade para os casos notificados no Brasil é de aproximadamente 9% (MINISTERIO DA SAÚDE, 2018)

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Até então, poucos fatores de virulência foram confirmados com ensaios de mutagênese. Entre eles estão genes envolvidos na síntese de LPS, que são os principais componentes da membrana externa de *Leptospira*. O LPS é a principal estrutura utilizada para classificação sorológica. Contribui para a integridade estrutural das bactérias, uma vez que a quelação de cátions divalentes, que fazem as pontes

entre as moléculas de LPS, promove uma desestabilização da membrana externa (HAAKE; MATSUNAGA, 2010). Embora o LPS de *Leptospira* seja semelhante estrutural e imunologicamente ao de outras bactérias Gram negativas, eles possuem um lipídeo A particular, com uma unidade dissacarídica fosforilada e metilada, até então não descrita em outras bactérias (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Este lipídeo auxilia na ancoragem do LPS à membrana externa e na maioria das Gram-negativas é essencial para a sobrevivência das bactérias. Nas leptospiros, diferentemente de outras bactérias, há dois homólogos do gene *lpxD* (envolvido na biossíntese do lipídeo A), que auxiliam na estabilidade da membrana externa da bactéria quando esta muda de ecossistema (ambientes aquáticos para um hospedeiro) (ESHGHI et al., 2015). Ensaios de tomografia crio-eletrônica (Figura 3) revelaram que as moléculas de LPS parecem ser mais abundantes e longas em cepas patogênicas, como *L. interrogans*, quando comparadas com as de espécies saprófitas, como *L. biflexa* (RADDI et al., 2012). Dados de mutagênese mostraram que tais moléculas são um fator de virulência de *Leptospira*, pois mutantes que não produzem moléculas de LPS não são capazes de promover uma infecção bem sucedida (MURRAY et al., 2010). Também se demonstrou que o teor de LPS, em particular os níveis de antígeno O, estão associados à colonização dos túbulos renais (NALLY et al., 2005). Outra particularidade do LPS é que contrariamente a outras bactérias, onde o LPS é reconhecido pelo *Toll-like receptor 2* de células humanas, o LPS de *Leptospira* é reconhecido pelo *Toll-like receptor 4* (WERTS et al., 2001).

Estudos de mutagênese indicam ainda a existência de outros fatores de virulência de *Leptospira*, como por exemplo, as proteínas Loa22 (da família das proteínas OmpA), heme oxigenase (que auxilia na aquisição do grupo heme), FliY (*flagellar motor switch protein*), e FlaA2 (*flagellar filament outer layer protein*), as três últimas relacionadas à motilidade (revisado em FRAGA et al., 2015), proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo como a KatE, a chaperona ClpB, e HtpG, uma proteína homóloga a Mce que em *Micobacterium* auxilia a entrada deste patógeno na célula (ZHANG et al., 2012) e ColA, uma colagenase capaz de hidrolisar diversos colágenos in vitro (KASSEGNE et al., 2014).

Outros supostos fatores de virulência em *Leptospira* vem sendo estudados, como as proteínas LigA e LigB. Elas pertencem à superfamília de proteínas bacterianas com domínios de repetição imunoglobulina-*like* encontrados na intimina de *Escherichia coli* enteropatogênica e na invasina da *Yersinia pseudotuberculosis*. As proteínas Lig são capazes de induzir uma resposta de anticorpos em pacientes e animais infectados e interagem com diversos componentes da matriz extracelular dentre os quais fibronectina, laminina, colágeno, fibrinogênio, elastina e tropoelastina. Elas também contribuem para evasão imune de leptospiros patogênicos mediante a interação com os reguladores do complemento humano Fator H e a proteína ligadora de C4b (C4BP) (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012).

Outro exemplo de moléculas presentes na membrana, possivelmente relacionadas à virulência bacteriana em uma série de sorovares de *Leptospira* são as hemolisinas, assim denominadas por lisar eritrócitos (RAMARAO; SANCHIS, 2013). Pelo menos sete genes *sphA-like* foram detectados em leptospiros patogênicos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Entre as hemolisinas incluem-se as esfingomielinases, que catalisam a hidrólise de esfingomielina em ceramida e fosforilcolina. Com base em estudos de outras toxinas bacterianas, foi proposto que as esfingomielinases de leptospiros, independentemente de sua atividade catalítica, podem desempenhar funções moleculares adicionais em benefício da espiroqueta. Além de causar hemorragias, elas podem ter um papel na patogênese, como a capacidade de adesão à matriz extracelular, a aquisição de nutrientes, difusão e evasão imune (CARVALHO et al., 2009; NARAYANAVARI et al., 2012).

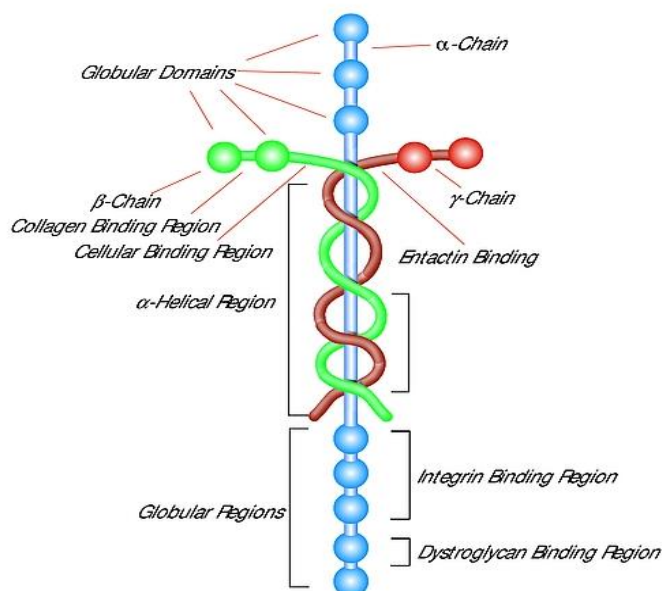
Ainda, foi descrito um grupo de seis proteínas de superfície, denominadas LenABCDEF, as quais possuem domínios *endostatin-like*. Alguns membros dessa família podem se ligar tanto ao regulador do complemento Fator H como ao componente de matriz extracelular laminina do hospedeiro (BARBOSA et al., 2006; STEVENSON et al., 2007). A abundante proteína de membrana LipL32 também se liga a diversos componentes de matriz como laminina, colágenos e fibronectina (HAUK et al., 2008).

1.4 MOLÉCULAS-ALVO DO HOSPEDEIRO: COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR E REGULADORES DO SISTEMA COMPLEMENTO

1.4.1 Laminina

A laminina é composta de três cadeias polipeptídicas, designadas como α , β e γ (Figura 5). A região C-terminal da laminina, contendo domínios globulares, é necessária para a ligação a integrinas, que são a principal classe de receptores de laminina. Além de possuir regiões de ligação a integrinas, a laminina pode se ligar ao colágeno, a domínios celulares, entactinas, distroglicano, heparan sulfato, heparina. Os mamíferos possuem 5 cadeias α (α 1-5), 3 cadeias β (β 1-3) e 3 cadeias γ (γ 1-3), cujas combinações dão origem a 16 isoformas distintas de laminina. Cada isoforma é expressa em uma forma específica do tecido de acordo com cada estágio de desenvolvimento, exercendo suas funções através da ligação das integrinas (revisado em SASAKI; FÄSSLER; HOHENESTER, 2004; YAMADA; SEKIGUCHI, 2015).

Figura 5 – Representação esquemática da laminina.



A laminina é composta de uma cadeia alfa central de aproximadamente 400 kDa, com um número variável de regiões globulares e duas cadeias de aproximadamente 200 kDa (beta e gama), com regiões helicoidais e globulares. Repetições ricas em cisteína são prevalentes em todas as cadeias de laminina. Possuem regiões de ligação a: colágeno, integrinas, domínios celulares, entactinas e proteoglicanos, como o distroglicano. Fonte: Laminin www.sigmaaldrich.com.

A laminina é uma glicoproteína multifuncional que desempenha um papel importante na morfogênese, sinalização e migração celular, assim como no reparo tecidual. Esta proteína está presente em diversos tecidos como parte da membrana basal, constituindo uma camada de proteção em torno dos vasos sanguíneos e capilares. Para invadir, patógenos são capazes de romper a lâmina basal e degradar proteínas da matriz utilizando proteases próprias ou do hospedeiro, como plasminogênio e metaloproteinases de matriz. A maioria dos patógenos associados com os sistemas respiratório, gastrointestinal, urogenital e também com o sistema nervoso central ou pele tem a capacidade de se ligar e degradar colágenos e laminina, a fim de aderir e invadir os tecidos do hospedeiro (SINGH; SU; RIESBECK, 2010). Os mecanismos pelos quais as leptospiros patogênicas invadem e colonizam o hospedeiro são ainda pouco conhecidos. Dentre as supostas adesinas de leptospiros descritas até então podemos mencionar algumas proteínas de ligação exclusiva a laminina como Lsa24 e Lsa27 e outras com espectro de ligação mais amplo como LigB, Lsa21 e LipL53. É possível que tais proteínas contribuam para a colonização de tecidos do hospedeiro (revisado em Vieira et al., 2014).

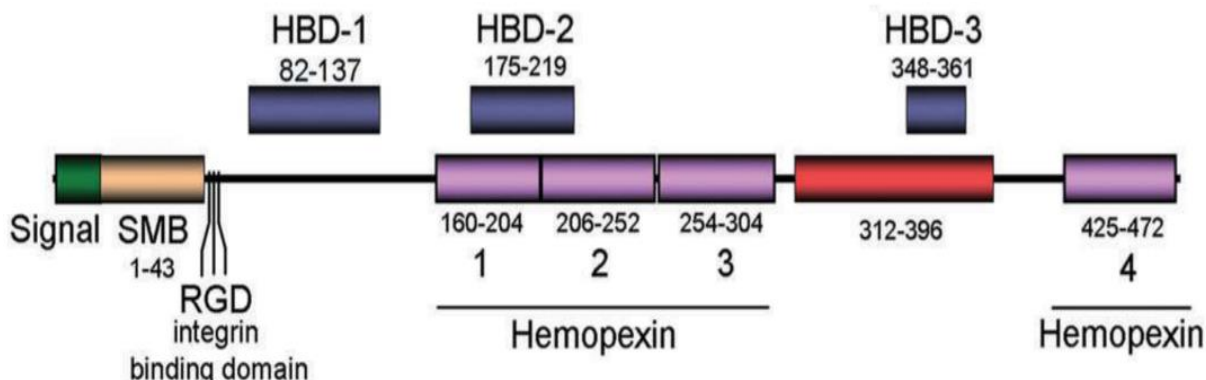
1.4.2 Vitronectina

Além da laminina, a vitronectina pode ser alvo de interação durante o processo de infecção. A vitronectina possui na sua porção N-terminal um domínio de 43 aminoácidos denominado somatomedina B, seguido do sítio RGD (Arg–Gly– Asp) de ligação a integrinas das células. Apresenta também quatro domínios hemopexina-like que hipoteticamente se ligam ao grupo heme, e três domínios de ligação a heparina. As proteínas E de *Haemophilus influenza* e a proteína de superfície A2 de *Moraxella catarrhalis* ligam-se à porção C terminal da vitronectina (HBD-3) (Figura 6). A vitronectina, que pode ser encontrada em diferentes tecidos humanos, é sintetizada principalmente no fígado e secretada para o plasma onde se encontra em concentrações elevadas (200-700 µg/mL) (BOYD; BRADWELL; THOMPSON, 1993; SU; RIESBECK, 2018). Valores particularmente elevados são observados no fígado, tonsilas palatinas, estômago, duodeno, coração, músculo esquelético e nos tecidos do pulmão, assim como em alguns carcinomas malignos.

A maior parte da vitronectina que circula no sangue encontra-se na forma monomérica (65 e 75 kDa), enquanto a vitronectina extravascular ancorada às células encontra-se na forma multimérica (PETERSON, 1998). A vitronectina desempenha um papel crucial em muitos processos biológicos, incluindo a migração celular, adesão e angiogênese. Também está envolvida na regulação da via terminal da ativação do complemento para limitar a resposta imune inata (PREISSNER; SEIFFERT, 1998; SU; RIESBECK, 2018). Dados da literatura sugerem que muitas espécies bacterianas interagem com vitronectina, mas o significado destas interações na patogênese ainda não foi totalmente elucidado. A vitronectina possui sítios de ligação distintos para agentes patogênicos e células epiteliais, e pode funcionar como uma ponte entre bactérias e células. Essa interação pode culminar na internalização do patógeno (SINGH; SU; RIESBECK, 2010).

A interação da vitronectina com diversos patógenos tem sido estudada por vários grupos. Há relatos de que esta molécula interage com bactérias Gram-negativas, como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori* e *Porphyromonas gingivalis* e também com bactérias Gram-positivas, dentre as quais várias espécies de *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*. Esta interação pode ser altamente vantajosa ao microorganismo, por conferir-lhe resistência ao soro, bem como facilitar a adesão e, subsequentemente, sua internalização nos tecidos (SINGH; SU; RIESBECK, 2010).

Figura 6 – Modelo esquemático dos domínios da molécula vitronectina.

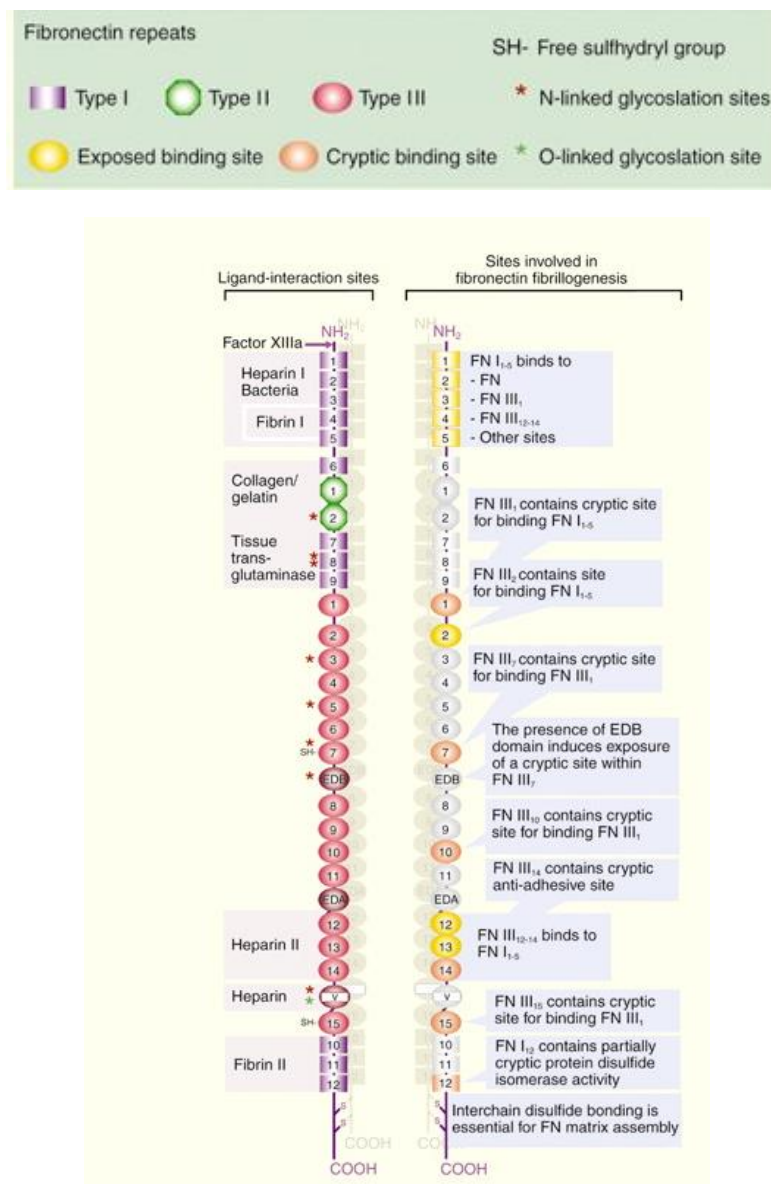


Modelo esquemático da vitronectina contendo um peptídeo sinal (verde), domínio somatomedina B (SMB, amarelo), domínio de ligação a integrina (RGD), domínios hemopexina-*like* (lilás), domínios de ligação a heparina (HBD, azul) e região de ligação às proteínas E de *H. influenzae* e a proteína A2 de *M. catarrhals* (vermelho). Fonte: adaptado de Singh et al. (2010).

1.4.3 Fibronectina

A fibronectina usualmente encontra-se como dímero composto de subunidades de aproximadamente 250 kDa ligadas covalentemente perto da região C-terminal por ligações dissulfeto. Cada monômero possui três tipos de unidades de aminoácidos repetidas (repetições tipo I, II e III) (Figura 7) (PANKOV; YAMADA, 2002). A fibronectina é secretada por vários tipos de células no espaço intercelular circundante, conecta o citoesqueleto intracelular com a matriz extracelular e serve como suporte para a adesão e migração celular. Além de regular a proliferação e diferenciação celulares, a fibronectina é uma importante molécula de regeneração dos tecidos, migração, proliferação e contração de células envolvidas no processo de cicatrização como também angiogênese. (revisado em WANG; NI, 2016). A fibronectina possui sítios de ligação a integrinas (LIAO et al., 2002), glicosaminoglicanos, colágenos, fibrina, actina, DNA, etc (MOSHER, 1989). Bactérias possuem diversas adesinas que se ligam a esta glicoproteína (ENDERSON et al., 2011; STOFFELS; ZHAO; BARON, 2013).

Figura 7 – Representação esquemática da fibronectina.



A fibronectina possui três tipos de unidades de aminoácidos repetidas, repetições tipo I (roxo), II (verde) e III (vermelho). Pode-se observar, à esquerda, os sítios de ligação a bactérias, fibrina, heparina e colágeno. Fonte: Pankov e Yamada (2002).

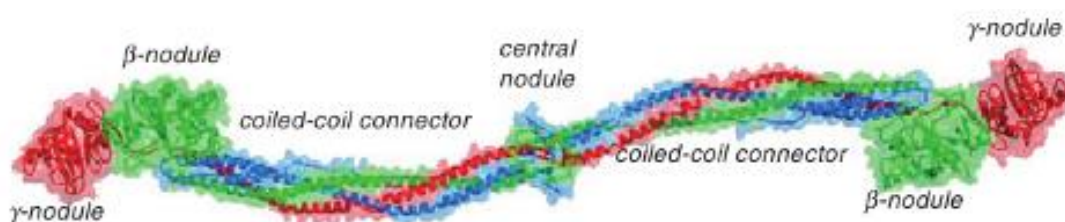
1.4.4 Fibrinogênio

O fibrinogênio é uma glicoproteína homodimérica de 340 kDa. Possui seis cadeias polipeptídicas: 2A α , 2B β , e 2 γ ligadas por 29 pontes dissulfeto. Todas as seis cadeias de fibrinogênio são montadas com seus N terminais localizados em um “nódulo E” central e se estendem para fora em um arranjo de bobina enrolada. (Figura 8) (KATTULA; BYRNES; WOLBERG, 2017; ZHMUROV et al., 2011).

A síntese de fibrinogênio ocorre principalmente nos hepatócitos, e sua meia-vida é de aproximadamente 3 a 4 dias (Revisado em STANG; MITCHELL, 2013)

O fibrinogênio é uma importante proteína da cascata de coagulação presente no plasma. Durante a lesão vascular e tecidual, ela é convertida enzimaticamente pela trombina em fibrina e, posteriormente, em um coágulo sanguíneo à base de fibrina. O fibrinogênio funciona principalmente para ocluir os vasos sanguíneos e, assim, parar o sangramento excessivo. No entanto, os coágulos de fibrina são dissolvidos pelo sistema fibrinolítico, atuando em uma série de reações enzimáticas com *feedback* positivo e negativo (DE MOERLOOSE; CASINI; NEERMAN-ARBEZ, 2013; WEISEL; LITVINOV, 2017).

Figura 8- Estrutura cristalográfica do fibrinogênio.



O nódulo central, formado pelas porções N-terminais de todas as seis cadeias, é conectado aos nódulos β e γ distais formados pelas porções C-terminais das cadeias β e γ, respectivamente. Fonte: Zhmurov et al. (2011)

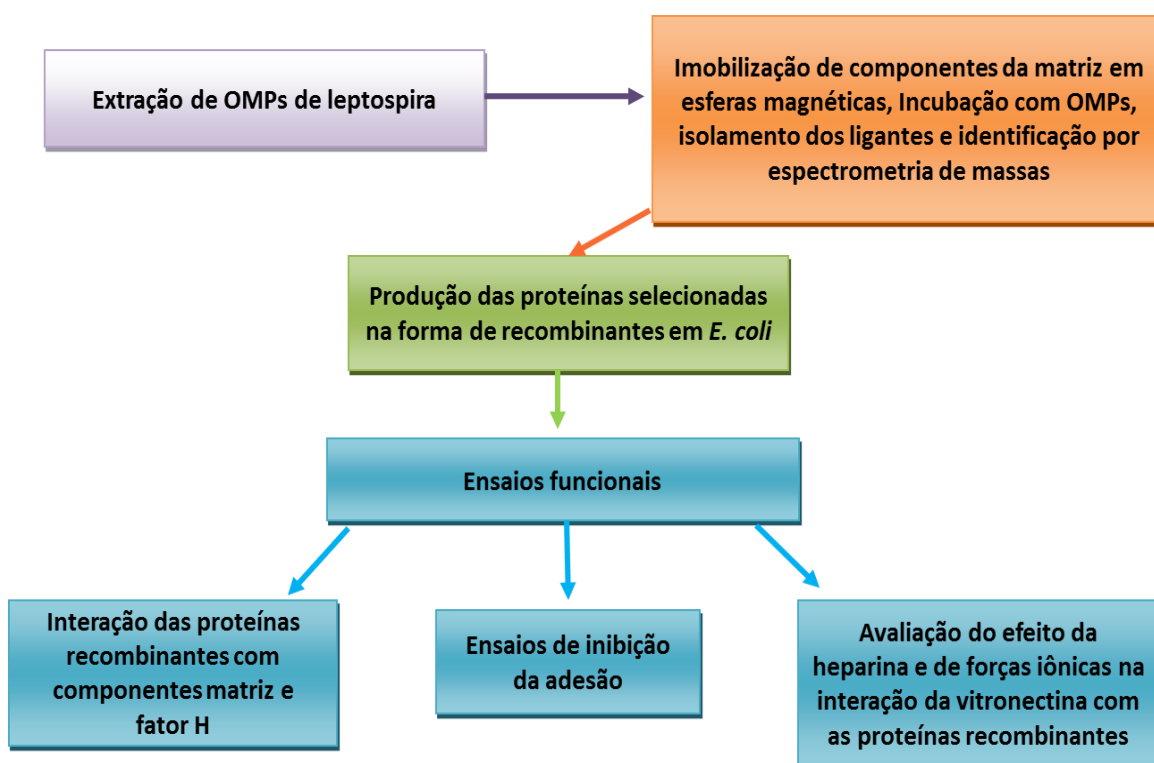
Muitas bactérias patogênicas interagem com fibrinogênio, como *Staphylococcus*, os quais expressam receptores de superfície (proteínas de superfície com regiões ricas em repetições serino-aspartato) que são específicos para fibrinogênio e fibronectina. Uma destas proteínas é a Efb (*extra-cellular fibrinogen-binding protein*). Esta proteína pode se ligar a plaquetas, recrutar fibrinogênio e inibir a ativação plaquetária (AUBRON et al., 2014; HAMZEH-COGNASSE et al., 2015).

O FH é alvo de vários microorganismos patogênicos, como *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* (THOMSON; PLECHA; KRUKONIS, 2018), *Aspergillus fumigatus* (DASARI et al., 2018), *Streptococcus pneumoniae* (CODEMO et al., 2018), *Haemophilus influenzae* (HALLSTRÖM et al., 2008), *Borrelia burgdorferi* (HART et al., 2018). A aquisição de FH por leptospiros patogênicos confere um efeito protetor crucial para a sobrevivência destas bactérias *in vitro* (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). Algumas proteínas de *Leptospira* já foram descritas como ligantes de Fator H, como a LcpA (BARBOSA et al., 2010), LenA e LenB (*leptospiral endostatin-like protein A e B*) (STEVENSON et al., 2007; VERMA et al., 2010).

2 OBJETIVO

Identificação de proteínas de superfície de *Leptospira* que interagem com laminina, fibronectina, vitronectina, fibrinogênio e Fator H humanos.

2.1 ETAPAS DO TRABALHO



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SOLUÇÕES E REAGENTES

Eletroforese em gel de agarose:

Tampão TAE: tampão Tris-Acetato 40 mM pH 8,5, EDTA 1 mM, pH 8,5

Gel de agarose: 0,8 a 1% de agarose em tampão TAE

Tampão de amostra 10x: azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,5% e glicerol 50%

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

Acrilamida 30%: acrilamida 29% e N,N'-metilenobisacrilamida 1%

Tampão Tris-HCl pH 8,8: tampão Tris-HCl 1,5 M e SDS 0,1% pH 8,8

Tampão Tris-HCl pH 6,8: tampão Tris-HCl 0,5 M e SDS 0,1% pH 6,8

TEMED

Solução de persulfato de amônio: persulfato de amônio 10%

Butanol: n-butanol 91%

Tampão de amostra redutor 5 X: tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,8 azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 100 mM e SDS 2%

Tampão de amostra não redutor 5 X: tampão de amostra redutor 5 X sem β -mercaptoetanol

Tampão de corrida: tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3

Solução corante: ácido acético glacial 10%, etanol 45% e azul Coomassie R250 0,25%

Solução descorante: ácido acético glacial 10% e etanol 30%

Solução secante: ácido acético glacial 10% e etanol 50%

Western blot:

Tampão de transferência: Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,02% e metanol 20%

Tampão de bloqueio: leite desnatado 10% em PBS

Solução de Ponceau: Ponceau S 0,5% e ácido glacial 10%

Solução de revelação A: DAB/H₂O₂ (Sigma) que contém: DAB 0,05%, H₂O₂ 0.03%, em água deionizada ultrapura. Após adição da solução há formação de um precipitado de cor castanha na própria membrana onde houver reação. Para interromper a revelação adiciona-se água.

Solução de revelação B: Super Signal Wester Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) que contém duas soluções: uma com luminol e um amplificador da reação, e outra com H₂O₂.

ELISA:

PBS: cloreto de potássio 2,7 mM, cloreto de sódio 137 mM, fosfato dibásico de sódio 8,1 mM e fosfato de monobásico de potássio de 1,5 mM; pH 7,5

Solução de lavagem: PBS-Tween 20 0,05%

Solução de bloqueio: PBS-Tween 20 0,01% contendo 10% de molico

Solução de revelação: OPD 0,05% e H₂O₂ 0,015%, em tampão citrato pH 5,0

Solução stop: ácido sulfúrico (H₂SO₄) 8 N

Meios de cultura para bactérias

Os meios de cultura foram esterilizados por autoclavação a 121 °C por 20 min. Após o resfriamento, foram adicionadas soluções estéreis dos antibióticos segundo a contração final desejada.

Meios de cultura líquidos

LB: triptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1,0 %

Meio EMJH com BSA: EMJH (Difco) base (0,23%) enriquecido com 10% albumina bovina, 1,25% Tween 80 e vários mieras e vitaminas (Haake 2006)

Meios de cultura sólidos

Adição de ágar 1,5% na composição dos meios líquidos

3.2 CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Nesse estudo foram utilizadas *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm e *Leptospira biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I. Estas cepas 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 (Ellinghausen McCullough Johnson Harris) (Difco) com suplemento a base de BSA (Difco) para todos os ensaios, exceto para os ensaios de extração de proteínas de membrana em que as leptospirosas foram cultivadas em meio líquido EMJH (Difco) com 10% de soro de coelho enriquecido com L-asparagina (0,015%), piruvato de sódio (0,001%), cloreto de cálcio (0,001%) e cloreto de magnésio (0,001%) (BARBOSA et al., 2006).

As cepas de *Escherichia coli* empregadas estão descritas na Tabela 1. Todas são quimicamente competentes pelo tratamento com cloreto de cálcio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As bactérias foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani broth) ou placas ágar LB em condições aeróbias a 37°C e, dependendo de cada procedimento, foram ajustadas as condições de temperatura.

Tabela 1-Propriedades das cepas de *E. coli* utilizadas

Cepa	Características	Utilização	Proteína expressa	Referência
DH5α	Possui alta eficiência na transformação, estabilidade na inserção do plasmídeo, fornece alta qualidade de DNA plasmidial para minipreparações e auxila na seleção de colônias brancas e azuis	Clonagens e obtenção de plasmídeos em massa	Não se aplica	(WOODCOCK et al., 1989)
BL21 (DE3)	Alta eficiência na transformação (>1 × 10 ⁷ CFU/μg). Possui o gene RNA polimerase do fago T7 ligado ao promotor induzível por IPTG	Expressão de proteínas recombinantes	LIC12901 (regulador metabólico molibdato, domínio LRR), LipL41, LIC20001 (fragmento menor)	(New England Biolabs)
C43	Derivada da estirpe C41 (DE3). Possui um plasmídeo de expressão para as subunidades B e C da F-ATPase. Pode ser induzida com IPTG. Efetiva na expressão de proteínas tóxicas e de membrana.	Expressão de proteínas recombinantes	LIC20001 (fragmento maior) LruA/LipL71 e fragmento LysM	(MIROUX; WALKER, 1996)

3.3 BIOTINILAÇÃO E ISOLAMENTO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DE *LEPTOSPIRA*

A biotinilação de proteínas de superfície de leptospiiras foi realizada como descrito em Kunert et al. 2007 com algumas modificações. As bactérias (3×10^9 células/mL) foram lavadas em tampão (PBS pH 7,4, CaCl_2 1mM, MgCl_2 0,5 mM) e sedimentadas por centrifugação a 8°C por 25 min a 5432 x g. As proteínas de superfície foram marcadas com biotina, por incubação com 500 μL de EZLinkSulfo-NHS-LC-Biotin (400 μM) (Pierce) durante 1 h e 30 min no gelo. As bactérias foram lavadas 3 vezes em tampão (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, KCl 27 mM, CaCl_2 1 mM e MgCl_2 0,5 mM) e foram ressuspensas no mesmo tampão suplementado com *Cocktail* de inibidor completo de proteases (Roche). As bactérias foram lisadas por sonicação (2 ciclos de 5 min e um ciclo de 3 min). As proteínas de superfície biotiniladas foram purificadas por cromatografia de afinidade usando uma coluna de avidina (Monomeric Avidin kit - Pierce). A coluna foi lavada com PBS pH 7,4 e depois foram adicionados 6 mL de solução de bloqueio/tampão de eluição. A coluna foi lavada com 8 mL de PBS pH 7,4 e se adicionou o preparado de proteínas biotiniladas. Após a passagem da amostra pela coluna, adicionou-se 0,25 mL de PBS pH 7,4. As proteínas foram incubadas por 1 h e 20 min, a 4°C. Após a incubação, a coluna foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 2 mL de PBS pH 7,4. Repetiu-se o processo até que fosse coletado um total de seis frações de 2 mL cada. Monitorou-se a presença de proteína medindo-se a absorvância de cada fração a 280 nm.

Para eluir as moléculas biotiniladas ligadas à coluna, adicionou-se tampão de eluição (D-biotina 2 mM em PBS) e coletaram-se seis frações de 2 mL. A absorvância de cada fração foi medida a 280 nm.

3.3.1 Extração das OMPs com o detergente sarcosil

As bactérias foram cultivadas em 3 L de meio líquido EMJH enriquecido (Difco). A coleta da massa bacteriana foi feita por centrifugação a 15214 x g, 4°C por 30 min. Em seguida, ressuspendeu-se o sedimento em Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 5 mM e centrifugou-se novamente a 10404 x g, 4°C por 20 min. O sobrenadante foi removido

e foram adicionados 5 mL de Tris-HCl 10 mM + EDTA 5 mM para cada grama de sedimento. Após ressuspensão, o material foi estocado a -20°C . Adicionou-se 1 mL de solução de *Cocktail* de inibidor completo de proteases e incubou-se por 30 min no gelo. Esse preparado foi lisado no *frenchpress* a 1000 psi, cinco vezes, e centrifugado a $5432 \times g$, 4°C por 20 min. O sobrenadante foi transferido e centrifugado a $104630 \times g$, 4°C por 1h 30 min. O sedimento foi ressuspendido em 1,5 mL de Tris-HCL 10 mM pH 8,0, lavado com 0,5 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e posteriormente foi incubado em 16 mL de solução sarcosil 1,67% e Tris-HCl 10 mM pH 8,0. O preparado foi submetido à agitação (agitador US2000A), na velocidade máxima, por 30 min e centrifugado a $15996 \times g$, 4°C por 1h 30 min. O sedimento foi ressuspendido em 1,5 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e incubado a 4°C sob agitação. As proteínas extraídas foram estocadas em microtubos de 1,5 mL a -80°C . A concentração protéica foi estimada por Bradford.

Amostras de proteínas de membrana de leptospiras obtidas pelos métodos supracitados foram submetidas à análise em SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados por prata.

3.4 INTERAÇÃO DAS OMPS COM MOLÉCULAS DO HOSPEDEIRO POR OVERLAY

Amostras de OMPs obtidas por biotilação ou por extração com sarcosil foram submetidas a SDS-PAGE 12% e transferidas para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio com BSA 5% (fibrinogênio, laminina e fibronectina) ou leite desnatado 10% (vitronectina e Fator H) a 4°C por 16 horas, as membranas foram incubadas por 1h 30 min com 10% de soro humano normal (SHN) como fonte de Fator H ou de vitronectina, ou com 100 μg de laminina, fibronectina ou fibrinogênio purificados. Após três lavagens com PBS-T (PBS pH 7,4 com 0,05% de *Tween-20*), as membranas foram incubadas por 1 h com os anticorpos primários específicos (1:5000) diluídos em PBS-T contendo 5% de leite desnatado ou BSA 3% dependendo da molécula. Após três lavagens com PBS-T foram incubadas com anticorpos secundários conjugados a peroxidase por 1 h, diluídos em PBS-T contendo 5% de leite desnatado ou BSA 3%. Após três lavagens com PBS-T, a revelação foi feita usando o *kit Super Signal West*

Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) e o filme fotográfico Hyperfilm (GE Healthcare).

3.5 ISOLAMENTO DE LIGANTES DE LAMININA, FIBRONECTINA, FIBRINOGENO, FATOR H E VITRONECTINA PRÉ-IMOBILIZADOS EM ESFERAS MAGNÉTICAS

O protocolo para isolamento de proteínas de leptospiros ligadas às moléculas do hospedeiro imobilizadas em esferas magnéticas foi feito como descrito em Kunert et al. 2007. Moléculas da matriz (previamente dialisadas contra o tampão de oxidação acetato de sódio 0,1 M pH 5,5) foram acopladas covalentemente a esferas magnéticas (Dynabeads M-270 Amine, Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Estas esferas foram incubadas com 200 μ L (~ 120 μ g) de proteínas de superfície de *Leptospira* durante 2 h a 37°C. Após três lavagens com PBS pH 7,4, as proteínas foram aquecidas por 5 min a 94°C e submetidas a SDS-PAGE 12%. As bandas correspondentes às proteínas de *Leptospira* que interagiram com as moléculas imobilizadas nas esferas foram visualizadas por coloração com prata. As bandas foram excisadas do gel e submetidas à análise por espectrometria de massas para identificação das proteínas.

3.6 IDENTIFICAÇÃO DOS LIGANTES BACTERIANOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os ligantes (proteínas bacterianas) foram analisados por espectrometria de massas. Os géis de SDS-poliacrilamida foram recortados em regiões de interesse, correspondentes aos ligantes mencionados acima, e os fragmentos foram submetidos ao processo de digestão tripsínica in gel segundo o protocolo descrito por (GOLDBERG et al., 2000). Inicialmente, os fragmentos de gel recortados foram incubados em 500 μ L de uma solução de metanol 50% e ácido acético 5% em água, por duas horas. Em seguida, essa solução foi removida por aspiração com pipeta e foram adicionados mais 500 μ L da mesma solução aos fragmentos, que permaneceram por mais uma hora nesta solução. Em seguida, os fragmentos de gel

foram desidratados pela incubação em 200 μ L de acetonitrila (ACN) 100%, por 10 minutos (2 vezes de 5 minutos). Após esta etapa, os pedaços de gel foram reidratados por 30 minutos em 30 μ L da solução redutora (ditiotreitól (DTT) 10 mM em solução de bicarbonato de amônio 100 mM). Decorrido o tempo de reidratação com DTT, os fragmentos de gel foram incubados por 30 minutos em 30 μ L da solução alquilante (iodoacetamida (IAA) 50 mM em solução de bicarbonato de amônio 100 mM) Em seguida, a solução alquilante foi removida e os pedaços de gel foram submetidos à incubação em 100 μ L de uma solução de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos, à temperatura ambiente. Após esta etapa, a solução de bicarbonato de amônio foi retirada e 200 μ L de ACN 100% foram adicionados sobre os fragmentos de gel, que foram incubados por 5 minutos. A solução de ACN foi removida e os fragmentos foram submetidos à incubação por 10 minutos em 200 μ L da solução de bicarbonato de amônio 100 mM. Na última etapa de desidratação, a solução de bicarbonato de amônio foi retirada e os fragmentos foram incubados por 10 minutos (duas vezes de 5 minutos) em 200 μ L de ACN 100%. Os fragmentos de gel foram então reidratados em 5 μ L de uma solução de tripsina (Sigma-Aldrich; 50 ng/ μ L em bicarbonato de amônio 50 mM), em banho de gelo, por 30 minutos. Em seguida foi adicionada uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM em volume suficiente para cobrir os pedaços de gel, que foram incubados em banho termostatizado a 37°C por 18 horas. A extração dos peptídeos do gel foi realizada com a adição de 30 μ L de uma solução de ácido fórmico (AF) 5% (solução de extração 1) e incubação por 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi transferida para um novo tubo e, sobre os fragmentos de gel foram adicionados 30 μ L de uma solução composta de AF 5% e ACN 50% (solução de extração 2). Após incubação por 20 minutos, a solução foi removida e transferida para o mesmo tubo contendo a solução de extração 1. A etapa de incubação dos fragmentos de gel com a solução de extração 2 foi repetida mais uma vez e as amostras de peptídeos extraídos foram submetidas à secagem em speed-vac. As amostras foram dessalinizadas utilizando Zip Tip C-18 (Millipore) seguindo o protocolo do fabricante e foram eluídas com 20 μ l de TFA a 0,1% em 50% de acetonitrila.

A mistura de peptídeos resultante foi analisada em um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) acoplado ao sistema *EASYnanoLC-II liquid chromatography* (Thermo Scientific) em um gradiente de 5 a 95% de solução B

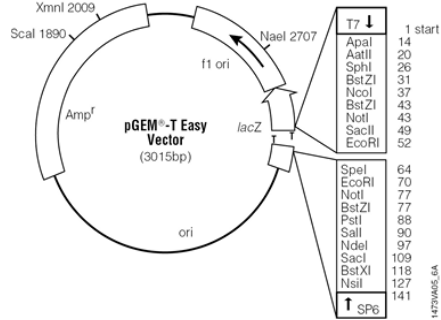
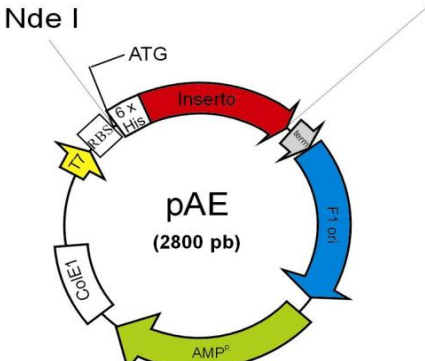
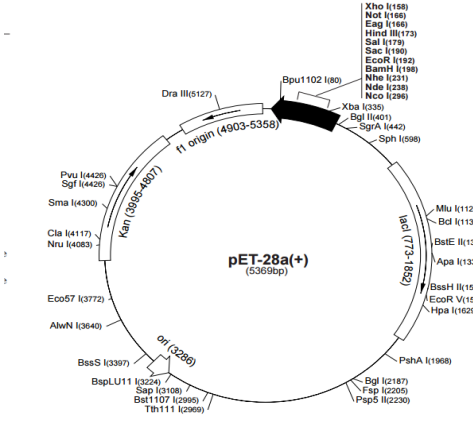
(ácido fórmico 0,1% em acetonitrila), a um gradiente de 200 nL/min utilizando uma precoluna preparada no laboratório (100 μm , I. D. x O.D 360 μm) empacotada com 5 cm de esferas C18 Jupiter (Phenomenex) de 10 μm ligados a uma coluna analítica (75 μm I.D. x OD 360 μm) com 15 cm de esferas AQUA (Phenomenex) de 5 μm operando no modo de aquisição dependente de dados. Cinco principais íons precursores em cada ciclo foram selecionados para fragmentação por dissociação induzida por colisão por 15 segundos. A fonte de ionização por *electrospray* foi ajustada para a voltagem de 2,4 kV e temperatura de 250 °C. O intervalo de varredura de massas considerado foi de 300-1.800 m/z , com resolução de 30.000. Os dados brutos foram convertidos para o formato *Mascot Generic Format* usando o *MS Convert* (ProteoWizard Software Foundation) e os espectros MS/MS foram pesquisados usando o software Mascot (Matrix Science Ltd. Versão 2.4.0) e analisados contra o banco de dados *Leptospira interrogans* acessado a partir do Uniprot em setembro de 2017. Como parâmetros de busca foram considerados, como modificação fixa a carbamidometilação de resíduos de cisteínas, e como modificação variável a oxidação de resíduos de metionina. A tolerância de massa para íons precursores foi definida como de 10 ppm para íons precursores e para os íons-filho $\pm 0,5$ Da. Proteínas foram selecionadas usando o Software Scaffold (version_4.4.4, Proteome Software Inc., Portland, OR), com os seguintes parâmetros: limite de proteína 95%, limite peptídeo 80% e número mínimo de peptídeos 1.

3.7 CLONAGEM E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS SELECIONADAS

3.7.1 Vetores

Para a clonagem dos fragmentos gênicos e para a expressão das proteínas recombinantes foram utilizados os vetores pGEM-T *easy vector* (Promega), pAE (RAMOS et al., 2004) e pET28a (+) (Novagen) (Tabela 2).

Tabela 2- Descrição dos vetores empregados neste trabalho

Vetor	Características
<p>pGEM-T easy vector (Promega)</p>  <p>Fonte: www.promega.com.br</p>	<p>Vetor linearizado para clonagem de produtos obtidos por reação em cadeia da polimerase (PCR) por ligação A-T com uma timina 3' em cada terminação. Este vetor possui os promotores T7 e SP6 da RNA polimerase flanqueando o sítio de clonagem múltipla dentro da região codificadora do peptídeo α da enzima β-galactosidase. A inativação do peptídeo α por inserção de fragmentos gênicos permite a seleção de clones recombinantes por <i>screening</i> de colônias brancas (positivas) ou azuis (negativas) na presença de X-Gal.</p>
<p>pAE</p>  <p>Fonte: (RAMOS et al., 2004)</p>	<p>Vetor utilizado na expressão e purificação de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>. Possui seis resíduos de histidina (6XHis) na região amino terminal que permitem a purificação da proteína por coluna de afinidade, um promotor do fago T7, um sítio de ligação ao ribossomo (RBS), um códon de iniciação ATG, um sítio de múltipla clonagem (SMC) e um gene de resistência a ampicilina (AMP^R) (RAMOS et al., 2004)</p>
<p>pET-28a(+) (Novagen)</p>  <p>Fonte: http://www.merckmillipore.com</p>	<p>O pET28a (+) é um vetor utilizado na expressão e purificação de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>. Ele possui seis resíduos de histidina (6XHis) na região amino terminal, uma sequência C-terminal His•Tag e um sítio de clivagem de trombina. Também apresenta um promotor do fago T7, e um gene de resistência a canamicina (KAN^R)</p>

3.7.2 Amplificação dos genes por PCR

Os genes LIC20001, LIC11003, LIC12901 e LIC12966 foram amplificados por PCR com os oligonucleotídeos descritos na Tabela 3 -, confeccionados com o auxílio do programa Gene Runner versão 5.1.06 Beta. Utilizou-se o DNA genômico da bactéria *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130, registrada no GenBank sob o número de acesso NC_005824.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos, tamanho dos fragmentos amplificados e massa molecular predita das proteínas recombinantes.

Gene ¹	Proteína	Primers (5' → 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Massa Molecular Predita (kDa)
LIC20001	Inteira	XhoI F: 5' <u>CTCGAGA</u> AATTCTGAATCAATTCTGAATCAGC3' R: 5' GCGAAGCTTCTATTTCGAAAACAAGAAG3' HindIII	2526	92
	Fragmento maior	EcoRI F: 5' <u>GAATTC</u> AATTCTGAATCAATTCTGAATCAGC3' R: 5' <u>CTCGAG</u> ACCAATTAACCCCGT 3' XhoI Internos: F: 5' CCTGACTATGGTTGGTCATC3' R: 5' TCCCCTGATTGCGCCAATTG3'	1890	71,9
	Fragmento menor (domínio discoidina)	XhoI F: 5' <u>CTCGAG</u> GGTCAATTGGAAGTTGGAATTC 3' R: 5' <u>GAAGCTT</u> CTAGTTGAGATCTGGCGTCGC 3' HindIII	465	18,9
LIC11003	LruA/LipL71 (Inteira)	EcoRI F: 5' <u>GAATTC</u> GAGGAATTAAGTGATGCAAAAAACT 3' R: 5' <u>CTCGAG</u> TGAAGATTTCCGGATTTTC 3' XhoI	1593	62
	LruA/LipL71 (Domínio LysM)	EcoRI F: 5' <u>GAATTC</u> CGGAAAAAAGTTCTGCGAG 3' R: 5' <u>CTCGAG</u> AGTCGGGCCTTT 3' XhoI	186	8,9
LIC12901	Regulador metabólico molibdato (Domínio LRR)	EcoRI F: 5' <u>GAATTC</u> CTATCCGGAACCAATTTGAAC 3' R: 5' <u>CTCGAG</u> CCATTTTGTGAGTTGATTGTA 3' XhoI	741	30,4
LIC12966	LipL41	XhoI F: 5' <u>CTCGAG</u> GTATTCCCGAAAGATAAAGAAGG 3' R: 5' <u>GGATCC</u> TACTTTGCGTTGCTTTCATC 3' BamHI	993	36,9

¹LIC: *Leptospira interrogans* Copenhageni Fiocruz L1-130.

As reações de PCR foram feitas em um volume final de 25 µL contendo 2 µL de DNA (100 ng/µL), 2,5 µL de *high fidelity PCR buffer* (Tris-SO₄ 600 mM pH 8,9), (NH₄)₂SO₄ 180 mM) (Invitrogen), 0,75µL de MgSO₄ (50mM), 0,5µL de dNTPs (10 mM), 1µL de oligonucleotídeo iniciador *forward* (10 pb/µL) e 1 µL de oligonucleotídeo iniciador *reverse* (10 pb/µL) para cada reação, 0,5 µL de *platinum taq DNA polymerase*

high fidelity (5 U/ μ L Invitrogen) e 16,75 μ L de água deionizada ultrapura. Para a amplificação foi usado o termociclador *mastercycler* (*Eppendorf*) com os seguintes ciclos: primeiro ciclo de 94°C por 5 min para desnaturação inicial, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 50°C por 1 minuto para o anelamento, 68°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão e o último ciclo de 68°C por 7 min para uma extensão final. Os produtos amplificados foram analisados em géis de agarose 1% e purificados com o kit *Pure Linkquick gel extraction* (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante. Os fragmentos foram adenilados utilizando-se 27 μ L dos produtos de PCR, 4 μ L de dATP (2 mM), 0,5 μ L taq polimerase (5 U/ μ L Invitrogen), 4 μ L de tampão da taq polimerase (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM) (Invitrogen), 1,2 μ L de MgCl₂ (50mM) e 2,8 μ L de água deionizada ultrapura em um volume final de 40 μ L, incubando-se a 72°C por 20 min.

3.7.3 Clonagem dos produtos amplificados no vetor pGEM-T e no vetor pET-28

A reação de ligação foi realizada em um volume de 20 μ L utilizando-se 50 ng de vetor pGEM-T *easyvector* (Promega) ou do vetor pET-28a(+) *expression vector* (Novagen), 200– 500 ng de inserto, 4 μ L de tampão de ligação (Tris-HCl 250 mM (pH 7,6), MgCl₂ 50 mM, ATP 5 mM, ditioneitol 5 mM, polietilenoglicol-8000 25% (p/v) (Invitrogen) e 1 μ L de T4 ligase (3 U/ μ L, Promega). As reações foram incubadas a temperatura ambiente por 1 h e, em seguida, a 16°C por 16-20 h.

3.7.4 Subclonagem dos genes no vetor de expressão pAE

As construções obtidas no vetor pGEM-T foram digeridas com enzimas de restrição apropriadas (Tabela 3 -). Os insertos purificados foram subclonados no vetor pAE. Na ligação foram utilizados 10 μ L de tampão de ligação (Tris-HCl 60 mM pH 7,8), MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM e polietilenoglicol 10%) (Promega), 1 μ L de T4 ligase (3 U/ μ L Promega) e quantidades otimizadas de inserto e vetor. Incubou-se a 15°C por 16-20h. Foram utilizados 5 μ L do produto de ligação na transformação de bactérias *E. coli* DH5 α por choque térmico de 2 min a 42°C. O DNA plasmidial foi extraído dos clones positivos, detectados por PCR, segundo já descrito.

3.7.5 Transformação na bactéria DH5 α

Cinco microlitros dos produtos de ligação foram adicionados a 50 μ L de *E. coli* DH5 α previamente descongelada em gelo por 10 min. As reações foram mantidas por 30 min no gelo. Realizou-se um choque térmico a 42°C por 3 min e mantiveram-se as preparações por mais 10 min no gelo. Os produtos foram adicionados a 945 μ L de meio líquido Luria Bertani (LB) e incubados a 37°C sob agitação a 250 rpm por uma hora. As bactérias foram semeadas em placas com meio sólido LB contendo canamicina 50 μ g/mL (Km50) ou contendo ampicilina 100 μ g/mL (Amp100), 5-bromo-4cloro-3-infol-beta-D-galactopiranosídeo (X-Gal) (20 mg/mL) e isopropyl-beta-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (0,1M). As placas foram colocadas a 37°C por 16-20h.

3.7.6 Seleção de clones e mini-preparação de DNA plasmidial

Para cada gene, cerca de 10 a 20 colônias brancas foram selecionadas e submetidas a PCR segundo as condições anteriormente descritas. Clones positivos foram inoculados em 5 mL de meio líquido LB-Amp100 ou Km50 dependendo do vetor e incubados por 16 horas a 37°C sob agitação a 250 rpm. As culturas contendo plasmídeos recombinantes foram utilizadas para a extração dos plasmídeos utilizando-se o kit de mini-preparação comercial da Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit).

3.7.7 Sequenciamento dos plasmídios

A análise da sequência de DNA dos plasmídeos recombinantes foi feita pelo método de Sanger (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), adaptado para sequenciador automático capilar ABI3100 (Perkin Elmer). O sequenciamento foi feito utilizando-se aproximadamente 150 ng das mini-preparações de DNA plasmidial e 1,6 pmol dos iniciadores. Empregou-se o kit *Big Dye Terminator* (Perkin Elmer) seguindo protocolo do fabricante. Os iniciadores M13F (5'GTAAAACGACGGCCAG 3') e M13R (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') foram utilizados no sequenciamento dos fragmentos

clonados no vetor pGEM-T *easy* e para o sequenciamento dos fragmentos clonados nos vetores pAE e pET-28 a(+) (Novagen) foram utilizados os iniciadores T7F (5´TAATACGACTCACTATAGGG 3´) e T7R (5´GCTAGTTATTGCTCAGCGG3´) e os iniciadores de cada fragmento.

3.8 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.8.1 LIC20001 (fragmento maior)

O vetor empregado para a expressão do fragmento maior da proteína codificada pelo gene LIC20001 foi o pET-28 a(+) (Novagen). Bactérias *E. coli* C43 foram transformadas com as construções obtidas e as colônias foram selecionadas em placas LB-Km50. Para indução da expressão foi feito um pré-inóculo do clone positivo em 5 mL de meio LB-Km50 e incubou-se a 37°C sob agitação (250 rpm) por 16-20 horas. O pré-inóculo foi adicionado a um frasco contendo 500 mL de meio LB-Km50 e o inóculo foi incubado sob as mesmas condições até que se atingisse uma DO_{600nm} entre 0,4 e 0,6. Foram retirados 2 mL de cultura para o controle antes de induzir. Para a indução adicionou-se 0,1 mM de IPTG e incubou-se por 16-20 horas a 30°C sob agitação constante de 180 rpm. Após a incubação foram retirados 2 mL de cultura para o controle após indução. A cultura foi centrifugada por 20 min a 2075 x *g* a 4°C. O sedimento foi solubilizado em 50 mL de tampão de lise completo contendo 50 mL de PBS pH 7,4 modificado (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM pH 6,5), 500 µL de mistura de inibidores de proteases (fluoreto de fenil metilsulfonila 100 mM e benzamidina 100 mM dissolvidos em etanol), 10 mg de lisozima, 0,5% (v/v) Triton X-100, 1 µL de benzonase (250 U/µL, Sigma Aldrich), MgCl₂ 10 mM e procedeu-se à lise das bactérias. Após incubação por 30 min, as amostras foram sonicadas utilizando-se 3 ciclos (9s' On e 9s' Off) de 10 min. Centrifugou-se a 12.857 x *g* por 30 min a 4°C. A fração solúvel foi coletada e guardada a 4°C até a purificação.

A purificação da fração solúvel foi feita por cromatografia de afinidade a níquel adicionando-se 2 mL de *Ni-NTA Agarose 50%* (Qiagen) e incubando-se a 4°C, por 1 h, sob leve agitação. A amostra foi centrifugada a 200 x *g*, por 1 min, antes de ser adicionada à coluna. A coluna foi então lavada 3 vezes com 10 mL de tampão de

lavagem (PBS pH 7,4 modificado com 40 mM de imidazol). Por fim, a proteína purificada foi eluída 3 a 5 vezes com 1 mL de tampão de eluição (PBS pH 7,4 modificado com 250 mM de imidazol). As frações obtidas no processo foram analisadas por SDS-PAGE e quantificadas no NanoDrop (Thermo Scientific). Para a concentração e a retirada do imidazol, as frações foram centrifugadas 3 vezes por 10 min a 5000 x *g* a 4°C em tubos de filtração Amicon®ultra de 10k (Millipore). A proteína purificada foi analisada por imunodeteção com anticorpos anti-His.

3.8.2 LIC20001 (fragmento menor)

O fragmento menor da proteína LIC20001, que corresponde ao domínio discoidina, foi clonado no vetor comercial pGEM-T e após confirmação de sua identidade subclonado no vetor de expressão pAE. Para a expressão bactérias *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com as construções obtidas e as colônias foram selecionadas em placas LB-Amp100. Para indução da expressão foi feito um pré-inóculo de um clone positivo em 20 mL de meio LB-Amp100. Incubou-se a 37°C sob agitação contínua de 250 rpm a 37°C por 16-20 h. O pré-inóculo foi adicionado a 500 mL de meio LB-Amp100 e o inóculo foi incubado até que se atingisse uma DO_{600nm} entre 0,4 e 0,6. Foram retirados 2 mL de cultura para o controle antes de induzir. Para a indução adicionou-se 1 mM de IPTG e incubou-se por mais 4 horas nas mesmas condições. A cultura foi centrifugada por 20 min a 2075 x *g* a 4°C. O sedimento foi solubilizado em 50 mL de PBS contendo 500 µL de mistura de inibidores de protease, 50 mg de lisozima, e incubado por 30 min a 4°C. A amostra foi sonicada utilizando-se 3 ciclos (9s' On e 9s' Off) de 10 min. Centrifugou-se a 12857 x *g* por 30 min a 4°C. O sedimento (fração insolúvel) foi ressuspendido em 50 mL de PBS pH 7,4 contendo uréia 8 M e mantido por 16-20h sob agitação a 4°C. Após solubilização e centrifugação por 10 min a 4°C e 12.000 x *g*, o sedimento bacteriano foi submetido a cromatografia líquida de afinidade com utilização de colunas de níquel acopladas ao sistema de purificação Äkta Prime Plus (GE Healthcare Life Sciences). A eluição das frações correspondentes às proteínas purificadas foi obtida com diluições crescentes do tampão PBS pH 7,4 imidazol 1 M e uréia 8 M. Os picos observados no cromatograma, correspondentes às proteínas purificadas, foram coletados e posteriormente dialisados

por 16-20h em tampão PBS pH 7,4 uréia 3M, seguido de 8 trocas de PBS pH 7,4, uréia 0,5M e duas trocas de PBS PH 7,4 (as trocas de tampões foram realizadas em intervalos de 4 horas). A proteína purificada foi analisada por imunodeteccção com anticorpos anti-His.

3.8.3 LruA/LipL71 e fragmento LysM (LIC11003)

O vetor empregado para a expressão da proteína LruA/LipL71 e do fragmento LysM (domínio rico em lisinas da proteína LruA/LipL71) foi o pET-28 a(+) (Novagen). Os procedimentos de transformação, indução e sonicação foram feitos sob as mesmas condições usadas para o fragmento maior da proteína que codifica o gene LIC20001 empregando-se para sua expressão a cepa C43. O extrato solúvel foi solubilizado em tampão solúvel (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 6,5) e submetido a cromatografia líquida de afinidade com utilização de coluna de níquel acoplada ao sistema de purificação Äkta prime Plus (GE Healthcare Life Sciences). A eluição das frações correspondentes às proteínas purificadas foi obtida com diluições crescentes do tampão B (tampão A contendo 1 M de imidazol). Os picos observados no cromatograma, correspondentes às proteínas purificadas, foram coletados. As frações mais puras foram reunidas. Na concentração das proteínas e na troca de tampão para PBS PH 7,4 foi usado o mesmo procedimento descrito para o fragmento maior da proteína LIC20001. As proteínas foram analisadas por imunodeteccção com anticorpos anti-His.

3.8.4 LIC12901 (Regulador metabólico molibdato, domínio LRR)

O vetor empregado para a expressão do domínio LRR, parte da proteína codificada pelo gene LIC12901, foi o pET-28 a(+) (Novagen). A transformação foi feita em bactérias *E. coli* BL21 (DE3), conforme descrito no item 3.8.1. A indução da expressão também foi feita conforme anteriormente descrito, à exceção da utilização de 0,01 mM de IPTG. A cultura foi centrifugada por 20 min a 2075 x *g* a 4°C. O sedimento foi solubilizado em 50 mL de tampão pH 8 contendo Tris 100 mM, EDTA 5mM, deoxicolato de sódio 0,1% e 50 µg/ml de lisozima. Após incubação por 15 min a temperatura ambiente, as amostras foram sonicadas utilizando-se ciclos de 9s' On e 9s' Off, com pausas de 1 min até as amostras apresentarem menor turbidez. Centrifugou-se a 12.000 x *g* por 15 min a 4°C. A fração solúvel foi descartada, e a insolúvel foi lavada para a remoção de contaminantes, seguindo um protocolo de lavagem que inclui uma lavagem duas vezes com solução contendo 100 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 0,1% de deoxicolato de sódio e uma vez com solução Tris 100 mM, EDTA 1 mM. As lavagens foram feitas adicionando-se 50 mL do tampão correspondente seguida de sonicação e centrifugação a 12000 x *g* por 15 min a 4°C. Após lavagem do sedimento, este foi diluído no tampão de renaturação (CAPS (C₉H₁₉NO₃S) 50 mM pH 11, EDTA 1 mM e arginina 0,5 M) até atingir uma densidade óptica de DO_{350nm} 1. A suspensão de corpúsculos foi colocada em saquinhos plásticos, que foram selados a vácuo e levados para um vaso de pressão (R4-6-40, *High Pressure Equipment*). Uma pressão de 2,4 kbar foi aplicada por 90 min. Em seguida as amostras foram descomprimidas lentamente até atingir a pressão de 0,4 kbar e incubadas por 16 h nessa condição. As amostras foram logo centrifugadas a 12000 x *g* por 15 min, dialisadas contra PBS PH 7,4, centrifugadas e estocadas a -20°C para posterior uso. A obtenção da proteína foi analisada por imunodeteção com anticorpos anti-His.

3.8.5 LipL41 (LIC12966)

Para a obtenção da proteína LipL41 foram empregados os mesmos procedimentos descritos para o fragmento menor da proteína LIC20001. Após a

centrifugação (20 min a 2075 x *g* a 4°C) o sedimento foi solubilizado em 50 mL de tampão Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 8,0 contendo 500 µL de mistura de inibidores de protease, 10 mg de lisozima 0,5% (v/v) Triton X-100, 1 µL de benzonase (250 U/µL, Sigma Aldrich), MgCl₂ 10 mM e incubado por 30 min a 4°C. A amostra foi sonicada utilizando-se 3 ciclos (9s' On e 9s' Off) de 10 min. Centrifugou-se a 12857 x *g* por 30 min a 4°C. A fração solúvel foi coletada e guardada a 4°C. Para a purificação, concentração e troca de tampão foi empregado o mesmo processo que foi feito para o fragmento maior da proteína que codifica o gene LIC20001. A proteína purificada foi analisada por imunodeteção com anticorpos anti-His.

3.9 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A identidade das proteínas purificadas foi confirmada utilizando-se *LTQ Velos Orbitrap Mass Spectrometer* (Thermo Scientific) , o programa Mascot versão 2.4.0 (Matrix Science, Londres, Reino Unido) e o banco de dados UniProt de *Leptospira interrogans*.

3.10 SDS-PAGE E WESTERN BLOT

As amostras coletadas não induzidas, induzidas e as frações coletadas após os processos de lise e purificação foram analisadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As proteínas foram coradas com Coomassie. Alternativamente, foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com 10% de leite em pó desnatado em PBS-T por 16 a 20 horas a 4°C. Após três lavagens de 15 min em PBS-T foram incubadas com anticorpo primário *anti-his* obtido em camundongo (Life Technologies) diluído 1:5000 em PBS-T por 60 min sob agitação a temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T por 15 min e incubadas 60 min sob agitação com anti-IgG de

camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich) na diluição 1:10000 em PBS-T. A membrana foi lavada três vezes por 15 min com PBS-T e a detecção foi realizada por quimioluminescência (*ELC-West Pico Pierce*).

3.11 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS PRODUZIDOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.11.1 Produção de anticorpos contra as proteínas recombinantes LIC20001 (fragmento maior e menor), LIC11003 (LruA/LipL71), LIC12901 (regulador metabólico molibdato) e LIC12966 (LipL41)

Antissoros contra as proteínas recombinantes foram produzidos em coelhos por outro membro do grupo e me foram gentilmente cedidos (aprovação Comitê de Ética – CEUAIB nº 9452010316). Previamente à imunização dos coelhos com as proteínas realizou-se a sangria pelo plexo auricular para obtenção de soro pré-imune, utilizado como controle negativo em alguns experimentos. Coelhos Nova Zelândia fêmeas de 4 a 6 semanas foram imunizados pela via intramuscular com 100 µg de cada proteína recombinante e 2,5 mg de hidróxido de alumínio utilizado como adjuvante em um volume final de 500 µL. Foram aplicados mais dois reforços com intervalos de 15 dias com a mesma preparação de proteína. Quinze dias após a última imunização os coelhos foram sangrados por punção cardíaca. Em todas as etapas o sangue coletado foi centrifugado por 5 min a 3.000 x g e o soro separado. O soro foi analisado por ELISA para determinação dos títulos de anticorpos.

3.11.2 Titulação dos soros por ELISA

As proteínas recombinantes LIC20001 (fragmento maior e menor), LIC11003 (LruA/LipL71), LIC12901 (regulador metabólico molibdato) ou LIC12966 (LipL41) foram diluídas em tampão carbonato 0,1 M pH 9,6 e imobilizadas (0,5 µg/poço) em placas de microdiluição de 96 poços por 16 horas a 4°C. A placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e este procedimento se repetiu entre cada etapa do protocolo que se segue. A seguir foram adicionados 200 µL de solução de bloqueio (leite em pó

desnatado 10% diluído em PBS-T) em cada poço e incubou-se por uma hora a 37°C. Posteriormente os poços foram lavados e foram adicionados os antissoros policlonais obtidos em coelho, em diluição seriada (1:40 até 1:102400) em tampão de diluição (1% de leite em pó desnatado e 0,01% de *Tween-20* diluídos em PBS pH 7,4). Incubou-se por uma hora a 37°C. Após lavagens foi adicionado anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase diluído 1:10000 em tampão de diluição e a placa foi incubada por uma hora a 37°C. A revelação foi feita aplicando-se 100 µL por poço de solução de OPD (0,05% ortofenilenodiamina e 0,015% de H₂O₂ em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5) e incubando-se por 10 min no escuro. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de H₂SO₄ 8 N. A leitura da absorbância foi determinada em um leitor de microplacas (Labsystems Uniscience, Multiskan EX) a 492 nm.

3.12 ENSAIO DE LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS PROTEÍNAS LIC12901 (REGULADOR METABÓLICO MOLIBDATO, DOMÍNIO LRR) E LIC20001 (FRAGMENTO MAIOR)

Os ensaios de microscopia eletrônica foram realizados em colaboração com a Dra. Cecília Abe do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Vinte mL de cultura de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I em EMJH (8×10^7 /mL de bactéria) foram centrifugados a 3200 x g, 16°C por 10 min. Os sedimentos foram ressuspensos em 500 µL de PBS pH 7,4 e lavados 3 vezes (centrifugações a 2300 x g por 10 min) com PBS pH 7,4 e fixados com paraformaldeído 4% em PBS pH 7,4 por 30 min em temperatura ambiente. As preparações foram lavadas três vezes com 500 µL de PBS contendo BSA a 0,2% (PBS-BSA 0,2%) (centrifugação a 2300 x g por 5 min a 22°C) e bloqueadas com 500 µL da mesma solução por 30 min. Em seguida, as preparações foram incubadas durante 16-18 horas a 4°C com os anticorpos primários anti-regulador metabólico molibdato (domínio LRR) e anti- LIC20001 (fragmento maior), ou com os respectivos soros pré-ímmunes (controle negativo), na diluição de 1:10 em PBS-BSA 0,2%. Após a incubação, as preparações foram lavadas 3 vezes com PBS pH 7,4 e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra, marcado com partículas de ouro coloidal - 10 nm (SigmaAldrich, Co., EUA) numa concentração de 1:10 em

PBS pH 7,4 durante três horas, a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS pH 7,4 as soluções foram centrifugadas a 2.300 x g por 5 min a 22°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em água. Dez microlitros de cada uma das preparações foram aplicadas sobre grades de níquel previamente revestidas com Formvar. Após 3 min, o excesso de líquido sobre a grade foi retirado com papel de filtro, e as preparações secas ao ar. As preparações foram observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (LEO 906E - LEO 906E, Zeiss, Alemanha) a 80 kV.

3.13 INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES COM LAMININA, FIBRONECTINA, VITRONECTINA, FATOR H, FIBRINOGENIO E COLÁGENO I

3.13.1 *Por overlay*

A interação das proteínas recombinantes com os componentes de matriz extracelular e com o Fator H foi avaliada por *overlay* sob as mesmas condições descritas acima no item 3.10. Resumidamente, as proteínas recombinantes foram submetidas a eletroforese em gel de poli(acrilamida em condições não desnaturantes, usando tampão de aplicação sem β -mercaptoetanol (SDS-PAGE) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio com BSA 5% (fibrinogênio, laminina, fibronectina e colágeno) ou leite desnatado 10% (vitronectina e Fator H), as membranas foram incubadas com 100 μ g de laminina, fibronectina, fibrinogênio ou colágeno I purificados ou com SHN (10%) como fonte de vitronectina ou Fator H. As membranas foram lavadas três vezes. Em seguida foram incubadas com anticorpos policlonais contra cada componente (numa diluição 1:5000 e para colágeno foi incubado com anti-colágeno IV 1:2000) e lavadas três vezes com PBS-T. Foram incubadas a seguir com anticorpos secundários conjugados com peroxidase correspondentes: para os ensaios com laminina, fibronectina, fibrinogênio e vitronectina foi empregado anti-coelho (1:5000), para colágeno anti-coelho (1:7000) e para Fator H foi usado anti-cabra (1:10000). Todos os componentes e anticorpos foram diluídos em PBS pH 7,4. Após três lavagens com PBS-T, a detecção foi realizada com o *kit Super Signal West Pico Chemiluminescent*

Substrate (Pierce) e as imagens detectadas por um fotodocumentador Alliance 2.7 (UVITEC Cambridge, Cambridge UK).

3.13.2 Avaliação da interação da proteína termolisina com vitronectina por ELISA

A proteína recombinante termolisina foi imobilizada em placa de microdiluição de 96 poços numa concentração de 1 µg por poço em 100 µL de PBS pH 7,4 e incubada 16 horas a 4°C. Após incubação foram feitas duas lavagens com PBS-T e o bloqueio foi feito com BSA 3% diluído em PBS pH 7,4 (200 µL/poço) por 2 horas a 37°C. Após uma lavagem com PBS-T foram adicionadas concentrações crescentes da molécula vitronectina (50-1000 ng) e a incubação foi feita por 1 hora a 37°C. Após três lavagens foi adicionado anti- vitronectina produzido em coelho (1:5000 diluído em PBS pH 7,4) e incubado por 1 hora a 37°C. Os poços foram lavados novamente, o anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase foi adicionado numa concentração de 1:10000, diluído em PBS pH 7,4 e incubado por mais 1 hora a 37°C. Após três lavagens a revelação foi feita adicionando-se 100 µL/poço de solução de OPD e incubando-se no escuro por 5 a 7 min. Foram adicionados 50 µL de H₂SO₄ 8 N para interromper a reação. A leitura da absorbância foi determinada em um leitor de microplacas (Labsystems Uniscience, Multiskan EX) a 492 nm. Como controle positivo do ensaio foi empregada a proteína LcpA (DA SILVA et al., 2015).

3.13.3 Avaliação do envolvimento dos domínios de heparina da vitronectina na interação com a proteína termolisina

Para avaliar um possível envolvimento dos domínios de heparina na interação da molécula vitronectina com a proteína termolisina, a proteína recombinante foi imobilizada em poços de placas de microdiluição conforme descrito acima. Após bloqueio foi feita uma lavagem com PBS-T e foram adicionadas soluções contendo quantidades crescentes de heparina (0,1 – 20 µg/mL) e vitronectina (10 µg/mL) diluídas em PBS pH 7,4 (100 µL por poço). Incubou-se por 1 hora a 37°C e a detecção da vitronectina ligada à termolisina foi feita conforme descrito acima.

3.13.4 Avaliação do papel de forças iônicas nas interações da proteína termolisina com a vitronectina humana

A proteína recombinante termolisina foi imobilizada conforme acima descrito. Após bloqueio foi feita uma lavagem com PBS-T e foram adicionadas soluções com vitronectina (10 µg/mL) e quantidades crescentes de NaCl (62,5, 125, 250, 500, 1000 mM) diluídas em PBS pH 7,4 (100 µL/poço). Após incubação por 1 hora a 37°C a detecção da vitronectina ligada à termolisina foi feita conforme descrito acima.

3.13.5 Avaliação da interação da proteína LIC20001 com diferentes tipos de colágeno por ELISA

Colágenos I, III, IV e V foram imobilizados nos poços de placas de microdiluição de 96 poços (1 µg/poço) por 16 horas a 4°C. Após duas lavagens com PBS-T foi feito o bloqueio com BSA 3% por duas horas a 37°C. Os poços foram lavados e o fragmento menor da proteína LIC20001 (0,5 µg/poço) foi adicionado e incubado por 1 hora a 37°C. Adicionou-se, então, antissoro específico produzido em coelho, numa concentração de 1:5000 diluído em PBS pH 7,4. Após incubação por 1 hora a 37°C foram feitas três lavagens com PBS-T e adicionou-se anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase numa concentração de 1:10000 diluído em PBS pH 7,4. Incubou-se por mais 1 hora a 37°C e após três lavagens a revelação foi feita adicionando-se 100 µL por poço de solução de OPD e incubando-se a placa por 8 min no escuro. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de H₂SO₄ 8 N. A leitura da absorbância foi feita a 492 nm em um leitor de microplacas (*Labsystems Uniscience, Multiskan EX*).

3.14 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ADESÃO DE LEPTOSPIRAS PELO FRAGMENTO MENOR DA PROTEINA LIC20001 (DOMÍNIO DISCOIDINA)

As moléculas de matriz extracelular colágeno IV, laminina, fibronectina e fibrinogênio foram imobilizadas em placas de microdiluição de 96 poços numa concentração de 1 µg por poço em 100 µL de PBS pH 7,4 e incubadas 16 horas a

4°C. Após incubação foram feitas duas lavagens com PBS-T e o bloqueio foi feito com BSA 3% diluído em PBS pH 7,4 (100 µL/poço). Incubou-se por 2 horas a 37°C e após o bloqueio foi feita uma lavagem com PBS-T e foi adicionado o fragmento menor da proteína LIC20001 (1 µg/poço). A incubação foi feita por 1 hora a 37°C. Após três lavagens com PBS-T as placas foram incubadas com 1×10^8 espiroquetas por poço por 1 hora a 37°C seguindo o protocolo descrito por Barbosa et al. 2006.

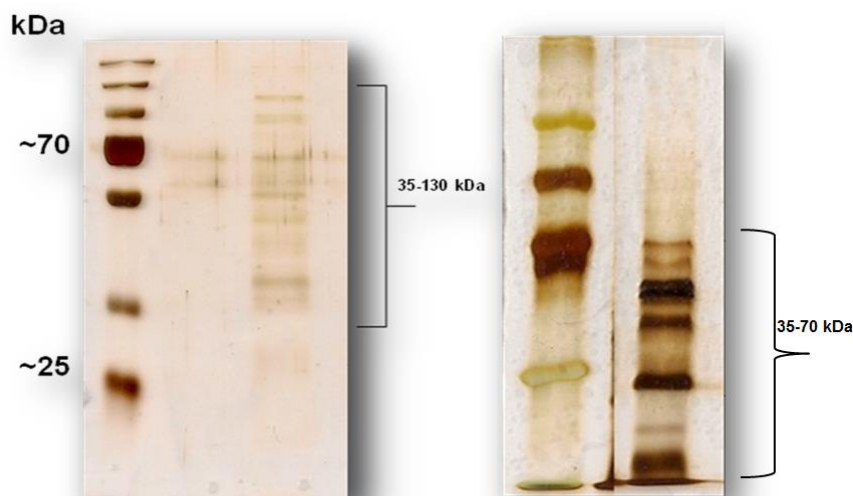
Após três lavagens com PBS a detecção das bactérias aderidas foi feita com um anticorpo específico para LipL32 produzido em camundongo, numa concentração de 1:5000 diluído em PBS pH 7,4, e incubado por 1 hora a 37°C. Após três lavagens com PBS, anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase foi adicionado numa concentração de 1:5000 diluído em PBS pH 7,4 e incubado por mais 1 hora a 37°C. Após três lavagens a revelação foi feita adicionando-se 100 µL por poço de solução de OPD e incubando-se a placa por 10 min no escuro. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de H₂SO₄ 8 N. A leitura da absorbância foi feita a 492 nm em um leitor de microplacas (*Labsystems Uniscience, Multiskan EX*).

4 RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DE *LEPTOSPIRA*

Para a obtenção das proteínas de superfície de *Leptospira* foram utilizados dois métodos. No primeiro, as proteínas de superfície foram marcadas por biotilação e isoladas utilizando uma coluna de afinidade de avidina. No segundo, utilizou-se um protocolo de extração com o detergente sarcosil. Os extratos foram fracionados por SDS-PAGE e os géis foram corados por prata (Figura 10). Estimou-se a concentração dos preparados de OMPs, obtendo-se 0,163 µg/µL (proteínas biotinizadas) e 0,589 µg/µL (extração com sarcosil).

Figura 10- OMPs obtidas por biotilação ou extração com sarcosil.



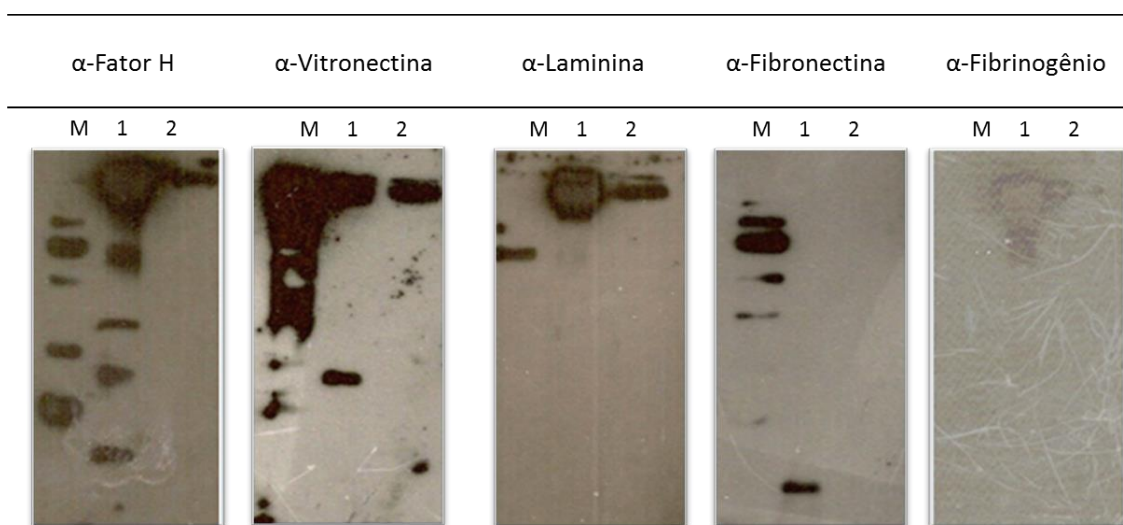
SDS-PAGE (12%) das OMPs obtidas por biotilação (esquerda) e extração com sarcosil (direita) coradas por prata. Marcador PAGERULER. Fonte: Cárdenas Arias (2018).

4.2 INTERAÇÃO DAS OMPs COM MOLÉCULAS DO HOSPEDEIRO

Com o objetivo de selecionar o melhor preparado de OMPs para os ensaios subsequentes, realizou-se um ensaio piloto de *Far-Western blot*. As OMPs obtidas por extração com sarcosil (Figura 10, canaleta 1) ou por biotilação (Figura 10, canaleta 2) foram submetidas a SDS-PAGE 12%, transferidas para membranas de

nitrocelulose e incubadas com soro como fonte de Fator H e vitronectina, ou com laminina, fibronectina ou fibrinogênio purificados. Após lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos. Para todas as moléculas analisadas, um maior número de ligantes bacterianos foi observado utilizando-se o preparado de OMPs obtido por extração com sarcosil (Figura 11). Portanto, optou-se por utilizar tal preparado nos ensaios subseqüentes com as esferas magnéticas.

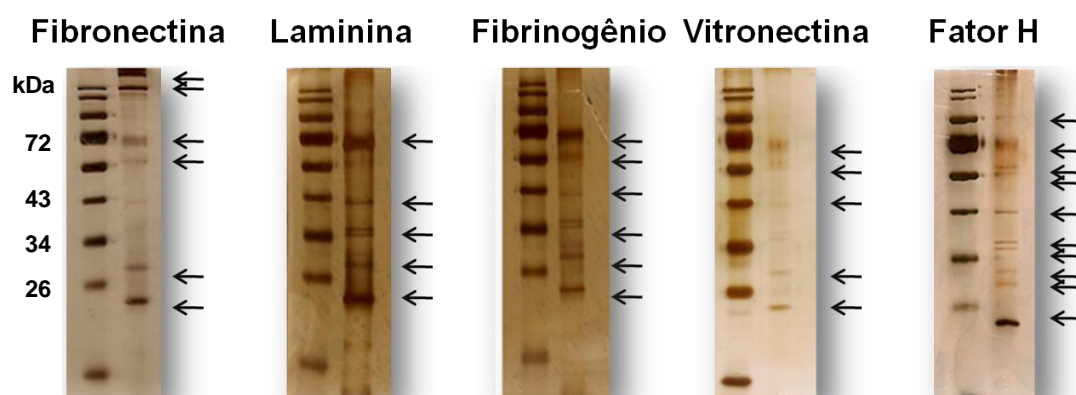
Figura 11- Ensaio piloto de *Far-Western blot*.



OMPs extraídas com o detergente sarcosil (1) ou obtidas pelo procedimento utilizando biotina (2) foram submetidas a SDS-PAGE 12%, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com SHN (10%) ou com 100 μ g de laminina, fibronectina ou fibrinogênio. As moléculas que interagiram com as OMPs foram detectadas com anti-Fator H, anti-vitronectina, anti-laminina, anti-fibronectina ou anti-fibrinogênio, todos na diluição de 1:5000. M: Marcador Pageruler. Fonte: Cárdenas Arias (2018).

Com o objetivo de identificar OMPs de *Leptospira* que interagem com moléculas do hospedeiro, adotou-se um protocolo de imobilização das moléculas-alvo em esferas magnéticas. Laminina, fibronectina, fibrinogênio, vitronectina e Fator H foram acoplados covalentemente às esferas e estas foram incubadas com OMPs (extraídas por sarcosil). Após as interações, as esferas foram lavadas e submetidas a SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados por prata. Pôde-se detectar uma série de bandas que potencialmente interagem com as moléculas testadas (Figura 12). As bandas foram excisadas e enviadas para identificação por espectrometria de massas.

Figura 12- OMPs que interagiram com diferentes moléculas do hospedeiro coradas por prata.



SDS-PAGE 12% das OMPs que interagiram com diferentes moléculas do hospedeiro coradas por prata. Marcador Pageruler (Thermofisher) Fonte: Cárdenas Arias (2018).

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS LIGANTES BACTERIANOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E SELEÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE

Diversas proteínas foram identificadas por espectrometria de massas, algumas com função conhecida e outras com função desconhecida (Apêndice I). Cinco proteínas, apresentando domínios relacionados à adesão, presentes apenas nas espécies patogênicas de *Leptospira*, foram selecionadas e produzidas na forma de recombinantes em *E. coli* para realização de ensaios funcionais que comprovem as interações observadas (Tabela 4- **Proteínas selecionadas para o estudo**. Tabela 4). As seguintes proteínas foram caracterizadas no presente estudo:

1. LIC13322 - trata-se de uma protease já estudada pelo nosso grupo (FRAGA et al., 2014), envolvida na degradação de fibrinogênio e decorina. Identificou-se uma interação desta proteína com vitronectina humana.

2. LIC20001 – proteína que contém um domínio discoidina; há relatos na literatura de que este domínio está envolvido na adesão a células e a vários tipos de colágeno (BORZA; POZZI, 2014). Detectou-se interação desta proteína com fibrinogênio, fibronectina e laminina.

3. LIC11003 (LruA ou LipL71) – essa proteína contém um domínio LysM, presente em outras bactérias patogênicas; proteínas contendo este domínio

interagem com vários componentes da matriz extracelular (HIRSCHHAUSEN et al., 2012). Detectou-se sua interação com laminina.

4. LIC12901 – proteína que apresenta um domínio *leucine rich repeat* (LRR) normalmente envolvido nos processos de adesão e invasão (MALHAS; ABUKNESHA; PRICE, 2002). Detectou-se sua interação com laminina.

5. LIC12966 (LipL41) – proteína com 4 domínios tetratricopeptídeos na porção C-terminal; em geral, tais domínios estão envolvidos em interações proteína-proteína. LipL41 já foi descrita como uma proteína envolvida nos processos de regulação e armazenamento de ferro (LIN et al., 2013). Detectou-se sua interação com fibronectina, fibrinogênio e Fator H.

Tabela 4- Proteínas selecionadas para o estudo.

	Proteína	Massa molecular (observada)	Referências
Fibronectina, Fibrinogênio, Laminina	LIC20001	92 kDa	Agarwal <i>et al.</i> , 2002; Leitinger e Kwan 2006 Carafoli e Hohenester 2013
Laminina	LIC11003 (LruA/LipL71)	71 kDa	Verma <i>et al.</i> 2005 Wu <i>et al.</i> 2016
Laminina	LIC12901 (Domínio LRR)	30 kDa	Loimaranta <i>et al.</i> 2009; Freiberg <i>et al.</i> 2004, Miras <i>et al.</i> 2015; Nitipan <i>et al.</i> 2013
Fibronectina, Fibrinogênio, Laminina, Fator H	LIC12966 (LipL41)	41 kDa	Shang <i>et al.</i> 1996; King <i>et al.</i> 2013, Lin <i>et al.</i> 2013
Vitronectina	LIC3322 (Termolisina)	70 kDa	Fraga <i>et al.</i> 2014

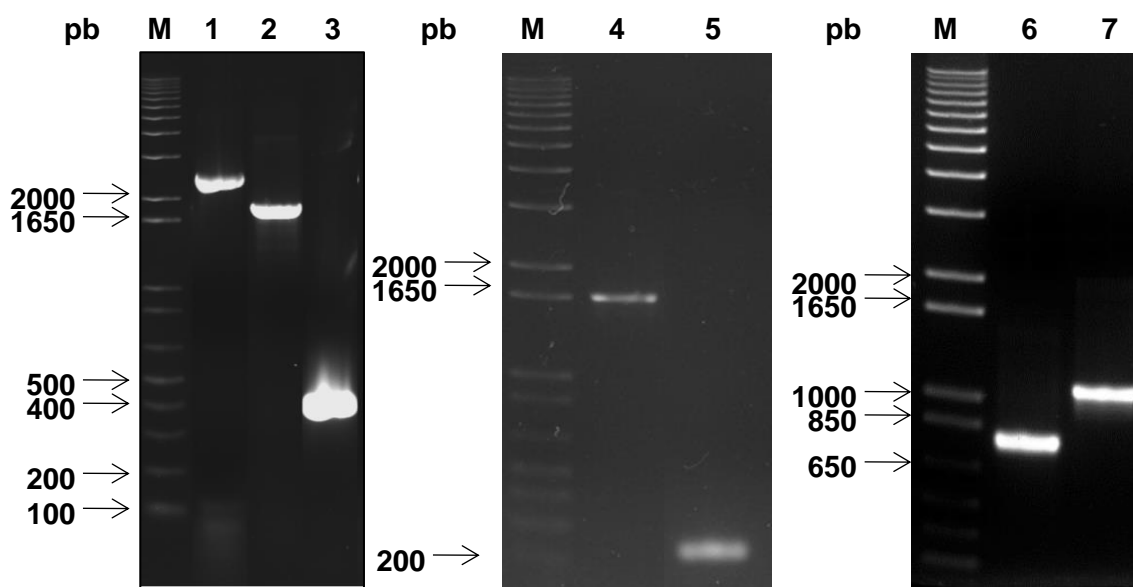
4.4 CLONAGEM E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS SELECIONADAS

4.4.1 Amplificação dos genes por PCR

Das cinco proteínas descritas na Tabela 4, quatro foram produzidas na forma recombinante. A termolisina, codificada pela LIC13322, já havia sido expressa e

purificada por outros membros do grupo. A proteína LIC20001 não foi produzida inteira. Neste caso foi obtida uma recombinante contendo boa parte da proteína (72 kDa) e outra correspondendo especificamente ao domínio discoidina (18,9 kDa). No que diz respeito à LIC12901, em se tratando de uma proteína muito grande, apenas o domínio LRR (30 kDa) foi produzido. Os genes de interesse foram devidamente amplificados e purificados para posterior clonagem (Figura 13).

Figura 13- Fragmentos amplificados por PCR



1. LIC20001 (2526 pb), 2. LIC20001 (Fragmento maior 1890pb), 3. LIC20001 (Fragmento menor 465pb), 4. LIC11003 (LruA/LipL71 1593pb) 5. LIC11003 (domínio LysM 186pb), 6. LIC12901 (domínio LRR 741 pb), 7. LIC12966 (LipL41 993 pb). M: Marcador 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen). Fonte: Cárdenas Arias (2018)

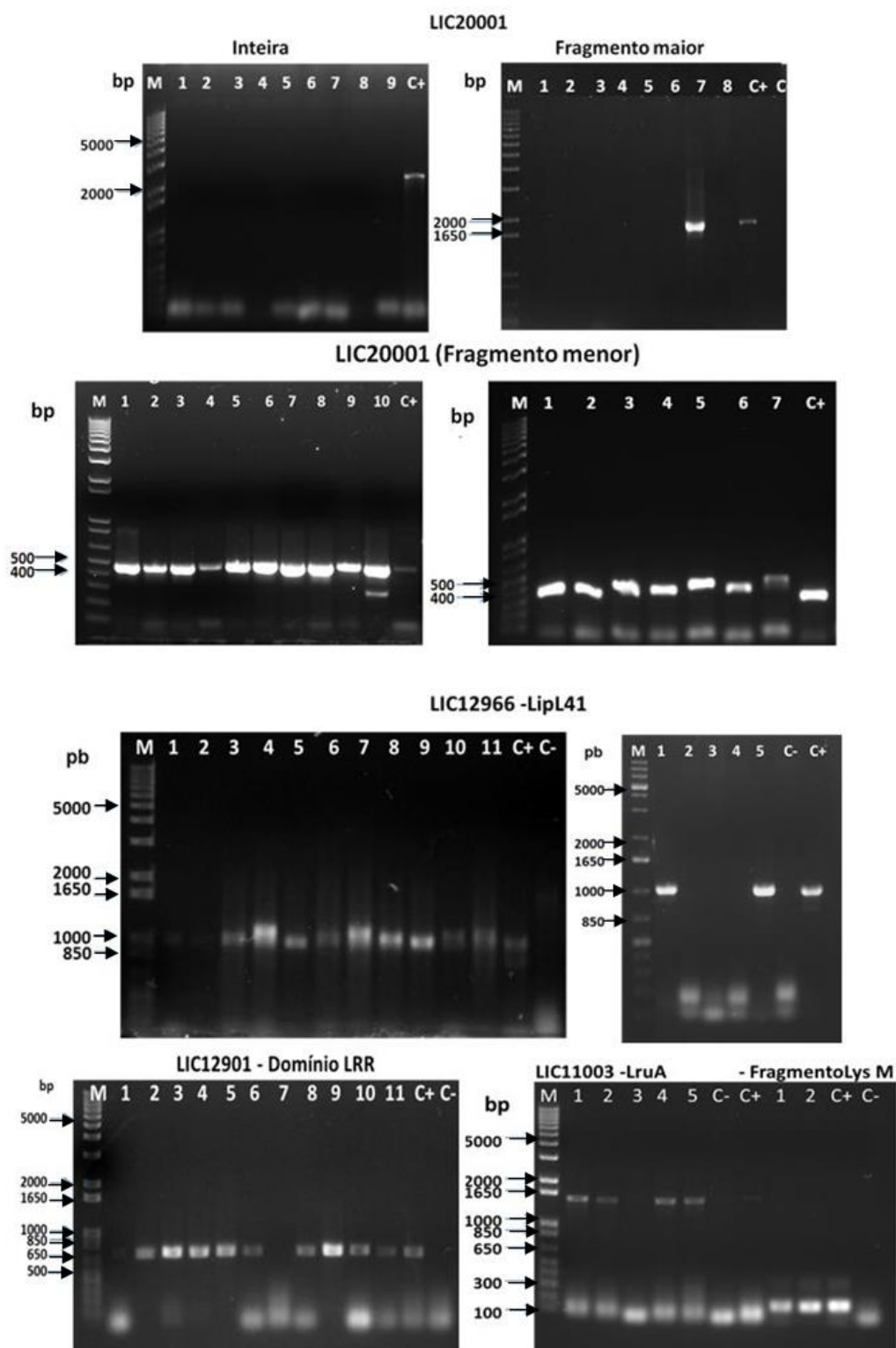
4.4.2 Clonagem dos produtos amplificados no vetor pGEM-T e no vetor pET-28

Os genes LIC12966 (LipL41) e LIC20001 (fragmento menor) foram clonados no vetor pGEM-T e posteriormente subclonados no vetor de expressão pAE. Os genes LIC20001 (fragmento maior), LIC12901 (domínio LRR), LIC11003 (proteína LruA/LipL71 inteira e seu domínio LysM) foram clonados diretamente no vetor de expressão pET-28a(+) (Novagen).

Colônias isoladas foram analisadas por PCR quanto à presença dos insertos de interesse (Figura 14). Clones positivos foram obtidos para todos os genes exceto para o gene que codifica a discoidina inteira (LIC20001). Obtiveram-se

minipreparações do DNA plasmidial dos clones selecionados e realizou-se sequenciamento utilizando os *primers* M13F e M13R (pGEM-T) ou T7R e T7F (pAE/pET-28a(+)) e, em alguns casos, *primers* específicos de cada gene ou *primers* internos. Os resultados do sequenciamento foram analisados utilizando o programa *Snappgene*. Todos os clones selecionados não apresentaram alterações.

Figura 14- Clonagem dos genes de interesse.



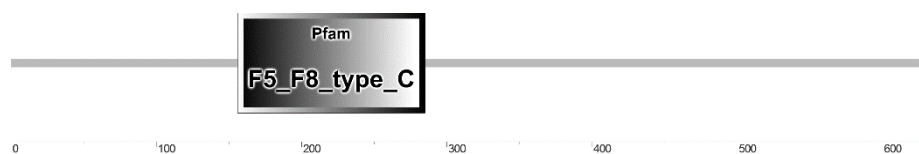
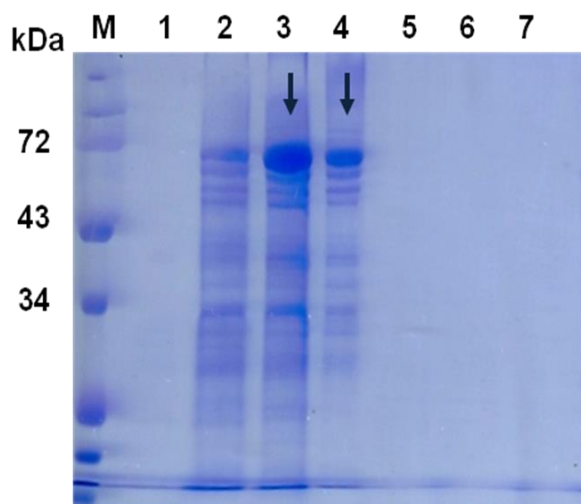
Seleção de clones por PCR: LIC 20001 (2526 pb) no vetor pGEM-T esquerda, LIC20001 (Fragmento maior) no vetor pET-28a(+) (Novagen) direita, LIC20001 (Fragmento menor 465 pb) no vetor pGEM-T esquerda, e direita no vetor pAE, (LipL 41 993 pb) esquerda no vetor pGEM-T, direita no vetor pAE, os demais clones no vetor pET-28a(+) (Novagen). LIC11003 (LruA/LipL71 inteira: 1593 pb, LruA/LipL71 (domínio LysM: 186 pb), LIC12901 (domínio LRR 741 pb). C+: DNA genômico *L. interrogans*. M. Marcador Gene Ruler 1kb Plus DNA (Invitrogen). Fonte: Cárdenas Arias (2018).

4.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

4.5.1 LIC20001 (fragmento maior)

Tentou-se, primeiramente, expressar esta proteína em *E. coli* BL21 (DE3), mas não se obteve sucesso. As construções foram então transformadas em *E. coli* C43 e se conseguiu obter a proteína na fração solúvel. A expressão do fragmento maior da LIC20001 foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. As frações do sobrenadante foram purificadas por cromatografia de afinidade a níquel. Na Figura 15 As frações 3 e 4, indicadas por setas, foram reunidas, concentradas em tubos de filtração Amicon®ultra de 10k (Millipore) e estocadas a -4°C. Junto com as frações coletadas, foram analisados os produtos de descarte após a lavagem. Apesar de perdas após as lavagens, a proteína obtida (72 kDa) apresentou concentração adequada para os próximos ensaios. A proteína foi analisada por espectrometria de massas e se confirmou sua identidade.

Figura 15- Análise das frações coletadas durante a purificação da proteína LIC20001 (fragmento maior) a partir do extrato solúvel.



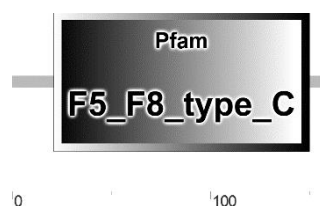
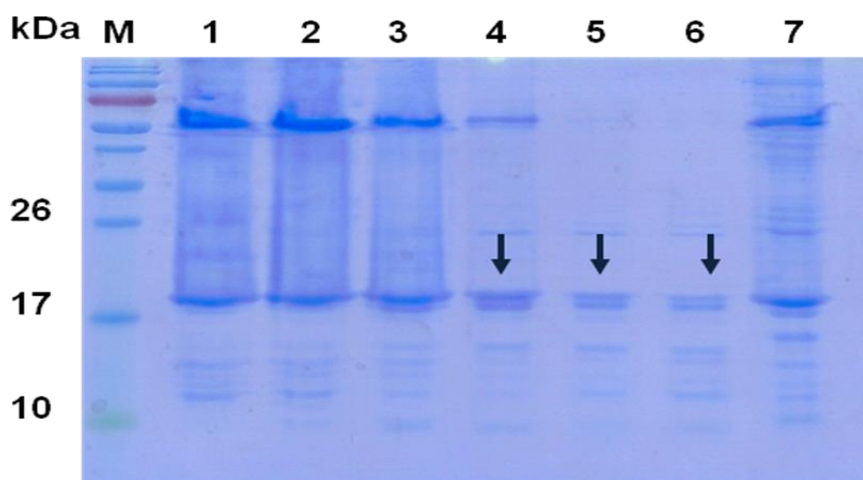
Acima: SDS-

PAGE 12% contendo a proteína LIC20001 (fragmento maior) (72 kDa). O gel foi corado com Coomassie. Marcador Pageruler, Os *pools* escolhidos estão indicados por setas. Embaixo: o fragmento proteico maior correspondente a proteína LIC20001 compreende os aminoácidos 1 a 625, incluindo o domínio discoidina indicado no retângulo cinza. Fonte: Cárdenas Arias (2018).

4.5.2 LIC20001 (fragmento menor)

A expressão do fragmento menor da proteína LIC20001 foi realizada em *E. coli* BL21(DE3). As bactérias foram transformadas com as construções plasmidiais acima mencionadas. A expressão da proteína foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. As frações do sedimento foram purificadas em coluna *HisTrap* acoplada ao Äkta. Observam-se bandas correspondentes aos tamanhos esperados (18,9 kDa) na Figura 16. As frações mais puras, indicadas por setas, foram reunidas, dialisadas e estocadas a -20°C.

Figura 16- Análise das frações coletadas durante a purificação do fragmento menor da proteína LIC20001 a partir do extrato insolúvel.



Acima: SDS-PAGE 12% contendo a proteína LIC20001 (fragmento menor) (18,9 kDa). O gel foi corado com Coomassie. Marcador Pageruler, Os *pools* escolhidos foram os que apresentaram menor contaminação, indicados na figura por setas. Embaixo: o fragmento proteico menor correspondente a proteína LIC20001 compreende os aminoácidos 136 a 258, incluindo o domínio discoidina indicado no retângulo cinza. Fonte: Cárdenas Arias (2018).

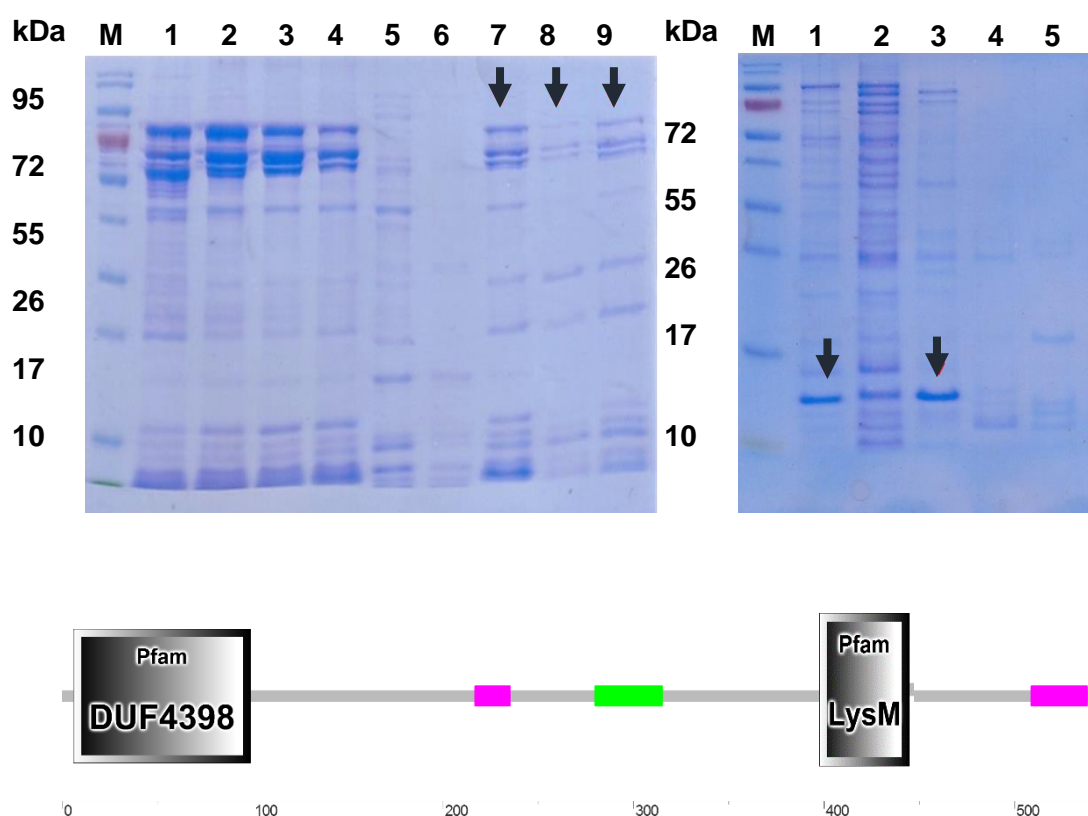
4.5.3 LruA/LipL71 e fragmento LysM

A expressão dessas proteínas foi feita em *E. coli* C43. A expressão da proteína LruA/LipL71 e do fragmento LysM foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e 15%, respectivamente. As frações do sobrenadante foram purificadas em coluna *HisTrap* acoplada ao Äkta.

As frações da LruA/LipL71 indicadas por setas na figura 4, foram reunidas, dialisadas e estocadas a -20°C. Três bandas são visualizadas no gel. Análise por espectrometria de massas confirmou a identidade e a pureza da referida proteína e, portanto, os fragmentos devem corresponder à proteólise

parcial da amostra (Figura 20). O fragmento proteico que supostamente deveria corresponder ao domínio LysM (Figura 17), apresentou massa molecular superior à esperada. Análise por espectrometria de massas não confirmou a identidade desse fragmento. Após várias tentativas de purificação não foi possível obter o fragmento. Isso pode ser atribuído à composição de aminoácidos da proteína, rica em lisinas, à agregação, à polaridade ou a outros fatores dificultem a interação entre as caudas de histidina da proteína e o agente ligante para sua purificação.

Figura 17- Análise das frações coletadas durante a purificação da proteína LruA e o do fragmento LysM a partir do extrato solúvel



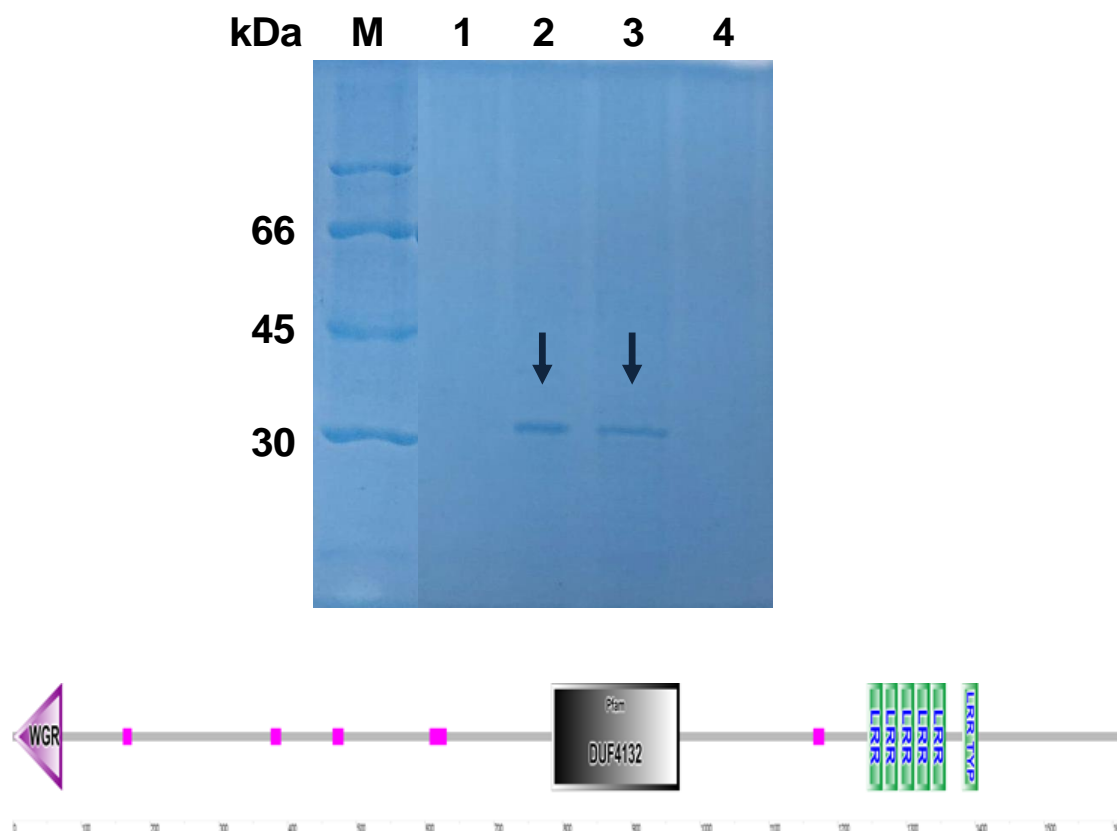
Acima: SDS-PAGE 12% da proteína LruA/LipL71 (71 kDa) (direita) e SDS-PAGE 15% do fragmento LysM da proteína LruA/LipL71 (8,9 kDa) (esquerda) corados com Coomassie. M marcador PAGERuler. *Pools* de tubos após a purificação pelo sistema Akta. Os *pools* escolhidos estão indicados nas figuras por setas. Embaixo: o fragmento proteico correspondente a proteína LruA/LipL71 compreende os aminoácidos 33 a 555, incluindo o domínio o domínio LysM que que por sua vez compreende os aminoácidos 411 a 467 da proteína. Fonte: Cárdenas Arias (2018).

4.5.4 Regulador metabólico molibdato, domínio LRR

A expressão do domínio LRR foi feita em *E. coli* BI21(DE3) e a purificação foi realizada a partir da fração insolúvel empregando-se, inicialmente, coluna de níquel acoplada ao sistema de purificação Äkta prime Plus (GE Healthcare Life Sciences). Como houve precipitação da proteína na etapa de renaturação empregou-se outra estratégia que consiste na solubilização dos corpúsculos e na renaturação proteica utilizando alta pressão hidrostática. Com este protocolo, normalmente se obtém um bom rendimento proteico. No entanto, durante a renaturação, houve agregação proteica levando à perda de aproximadamente 70% da proteína. Mesmo assim, pôde-se obter uma quantidade considerável, suficiente para produção de antissoro policlonal e realização dos ensaios funcionais previstos.

A proteína foi dialisada e armazenada em alíquotas a -4°C, que foram concentradas quando necessário. Na Figura 18 e na Figura 20 pode-se observar que a proteína LRR encontra-se pura e apresenta o tamanho esperado (30 kDa). A identidade deste fragmento foi confirmada por espectrometria de massas.

Figura 18- Análise do domínio LRR do Regulador metabólico molibdato purificado e dialisado.

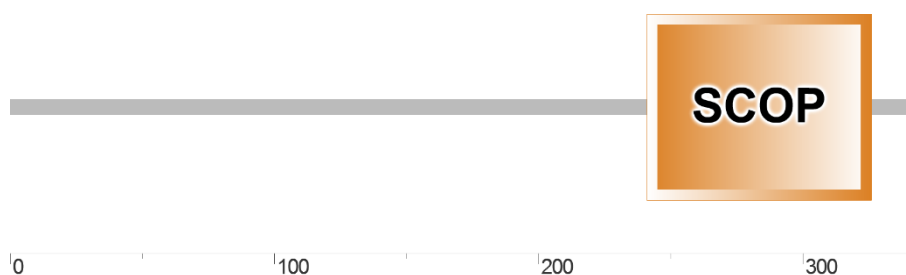
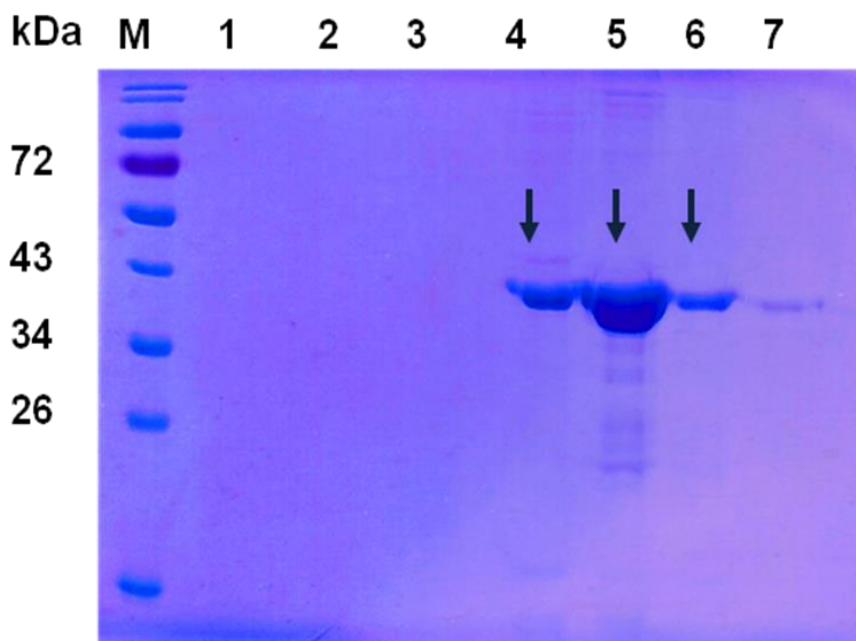


Acima: SDS-PAGE 12% corado com Coomassie. M: Marcador GE LMW. Canaleta 3 e 4: proteína concentrada (30 kDa). Embaixo: o fragmento proteico correspondente a proteína regulador metabólico molibdato, incluindo o domínio LRR (indicado em verde), este compreende os aminoácidos 1226 a 1465. Fonte: Cárdenas Arias (2018).

4.5.5 LipL41

Para a expressão da proteína LipL41, bactérias *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com as construções. A expressão da proteína foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e a proteína foi expressa na fração solúvel. As frações do sobrenadante foram purificadas em coluna *HisTrap* acoplada ao Äkta. Observam-se bandas no tamanho esperado (41 kDa) na Figura 19. As frações indicadas por setas foram reunidas, dialisadas e estocadas a -20°C . A proteína foi analisada por espectrometria de massas e confirmou-se sua identidade.

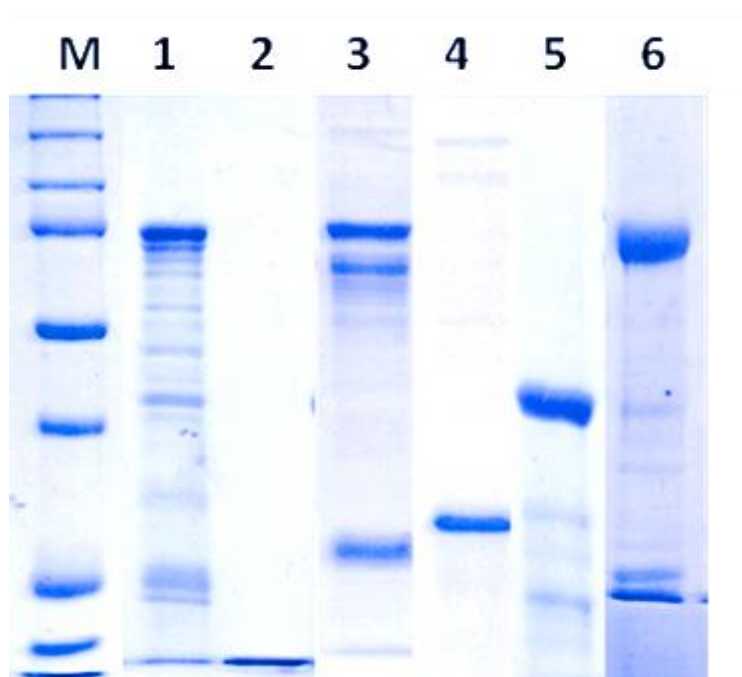
Figura 19- Análise das frações coletadas durante a purificação da proteína LipL41 a partir do extrato solúvel.



Acima: SDS-PAGE 12% corado com Coomassie. M marcador Pageruler. *Pools* de tubos após purificação pelo sistema Akta da proteína LipL41 (41 kDa). Os *pools* escolhidos estão indicados por setas. Embaixo: o fragmento proteico correspondente a proteína LipL41, este compreende os aminoácidos 30 a 355. Fonte: Cárdenas Arias (2018).

Todas as proteínas purificadas e utilizadas nos ensaios subsequentes são mostradas na Figura 20

Figura 20- Proteínas purificadas e concentradas.

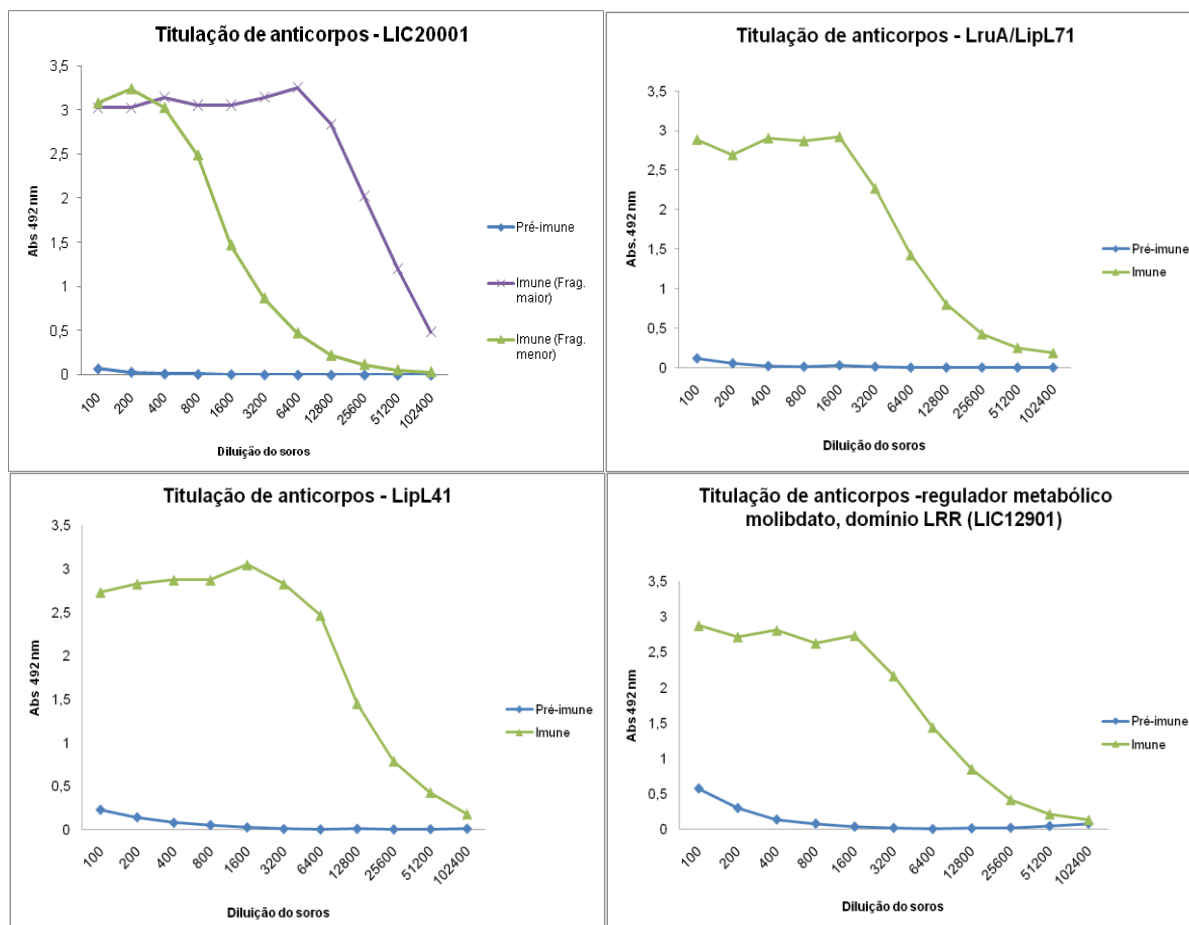


SDS-PAGE 12% corado com Coomassie. M. Marcador Dual color (biorad). 1. LIC20001 (fragmento maior) (72 kDa); 2. LIC20001 (fragmento menor) (18,9 kDa); 3. LruA/LipL71 (71 kDa); 4. Regulador metabólico molibdato, domínio LRR (30 kDa); 5. LipL41 (41 kDa); 6. Termolisina (70 kDa). Fonte: Cárdenas Arias (2018).

4.6 DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS PRODUZIDOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Os soros obtidos em coelho após a última sangria foram analisados por ELISA para obtenção dos títulos de anticorpos (Figura 21). Em todos os casos títulos de anticorpos superiores a 1:25600 foram observados, comprovando a imunogenicidade das proteínas.

Figura 21- Curvas de titulação de anticorpos produzidos contra as proteínas recombinantes.



Foram efetuadas três imunizações com a proteína recombinante em intervalos de 15 dias. Soros coletados antes das imunizações (pré-imune) foram utilizados como controle, os animais foram sangrados após 15 dias após da terceira imunização e o soro foi coletado (imune). A determinação do título dos anticorpos foi realizada por ELISA. Fonte: Cárdenas Arias (2018).

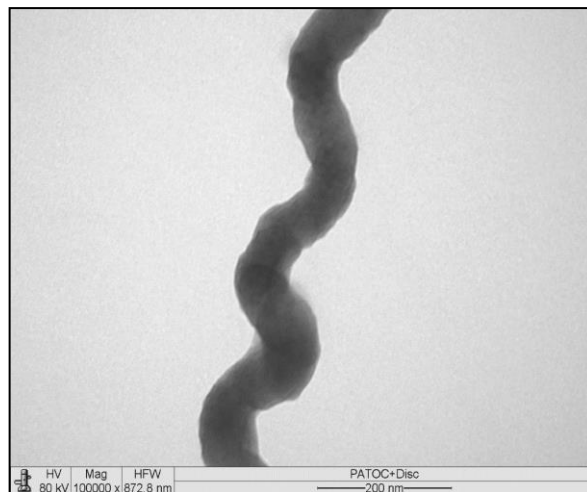
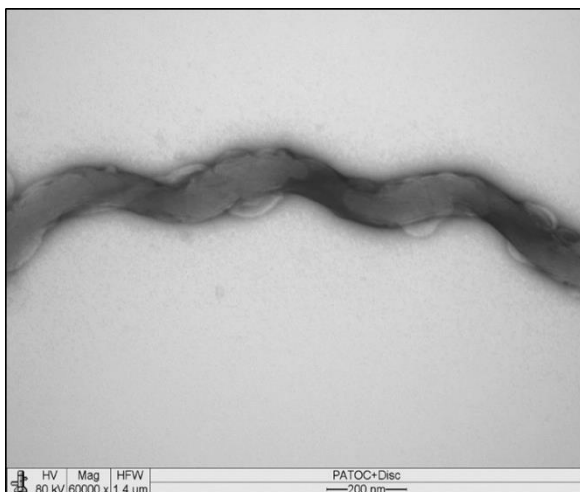
4.7 ENSAIO DE LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS PROTEÍNAS LIC20001 E REGULADOR METABÓLICO MOLIBDATO

Os ensaios de microscopia eletrônica foram realizados pela colaboradora Dra. Cecília Abe, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. A localização celular foi realizada para as proteínas contendo os domínios discoidina e LRR apenas. As demais mencionadas na Tabela 4 já foram descritas como proteínas de membrana. Os resultados revelaram que as proteínas nativas foram reconhecidas pelos soros produzidos em coelhos imunizados com as proteínas recombinantes, como mostram

as Figura 22 e Figura 23. Conforme esperado, observou-se marcação apenas na estirpe patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki Fromm. Vale lembrar que os genes que codificam estas duas proteínas estão ausentes na estirpe não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc Patoc I. Conclui-se, portanto, que as proteínas com domínio discoidina e LRR estão na superfície da bactéria Fromm.

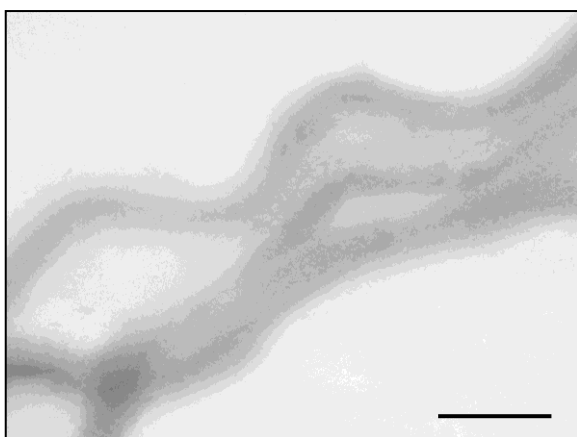
Figura 22- Localização celular da proteína com domínio discoidina (LIC20001).

***L. biflexa* Patoc I (anti-discoidina)**

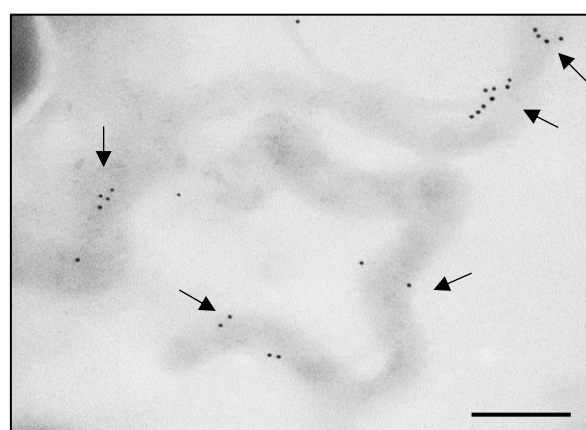


***L. interrogans* Fromm**

pré imune



anti-discoidina

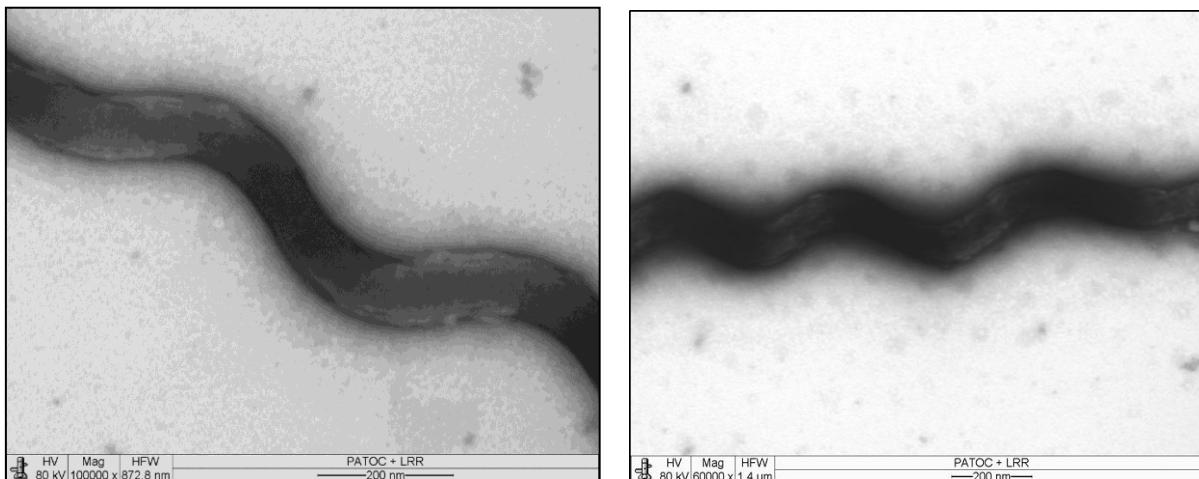


Barras, 200 nm

Leptospiras foram incubadas com anti-discoidina ou com soro pré-imune, em seguida foram incubadas com anti-IgG de coelho conjugado a ouro coloidal. A análise foi realizada usando um microscópio de transmissão de elétrons (LEO 906E - Leica Microsystems BmgH). Pontos onde houve marcação estão indicados por setas. Fonte: Cárdenas Arias (2018).

Figura 23. Localização celular da proteína com domínio LRR (LIC12901).

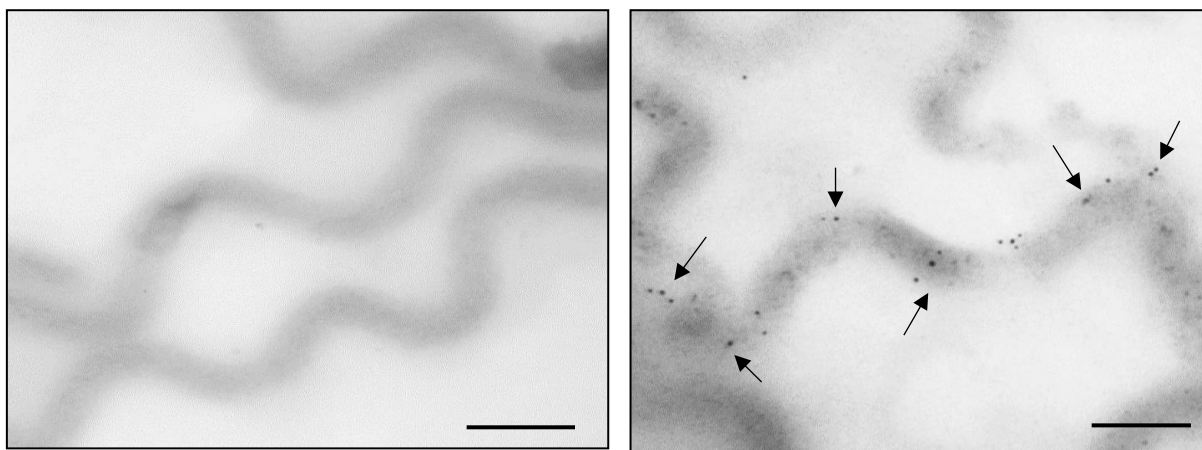
***L. biflexa* Patoc I (anti-LRR)**



***L. interrogans* Fromm**

pré imune

anti-LRR



Barras, 200 nm

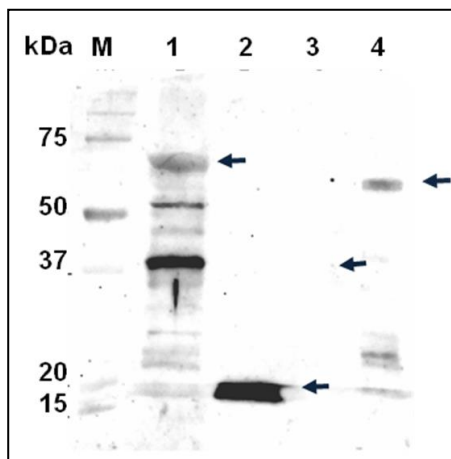
Leptospiras foram incubadas com anti-LRR ou com soro pré-imune, em seguida foram incubados com anti-IgG de coelho conjugado a ouro coloidal. A análise foi realizada usando um microscópio de transmissão de elétrons (LEO 906E - Leica Microsystems BmgH). Pontos onde houve marcação estão indicados por setas. Fonte: Cárdenas Arias (2018).

4.8 INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES COM LAMININA, FIBRONECTINA, VITRONECTINA, FATOR H, FIBRINOGENIO E COLÁGENO I

Conforme já mencionado, na primeira parte do projeto identificamos uma série de OMPs de *Leptospira* que interagem com as seguintes moléculas do hospedeiro: laminina, fibronectina, fibrinogênio, vitronectina e Fator H. As cinco proteínas escolhidas para este estudo interagem com as moléculas descritas na Tabela 4. Para confirmar estas interações foram realizados ensaios de Western blot com sobreposição utilizando as proteínas recombinantes produzidas em *E. coli*. As proteínas e seus controles foram submetidos à eletroforese (SDS-PAGE 12%) e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com fibronectina plasmática, laminina ou colágeno I purificados ou com 10% de SHN como fonte de Fator H e vitronectina. A detecção destas moléculas ligadas às proteínas recombinantes foi realizada com anticorpos específicos (Figura 21). Os resultados indicam que a proteína LIC20001 (sobretudo o fragmento menor de 18,9 kDa que representa o domínio discoidina) interage com fibronectina plasmática, laminina e fibrinogênio, confirmando os dados previamente obtidos mostrados na Tabela 4. Visto que há relatos na literatura de que outras proteínas que apresentam o domínio discoidina interagem com colágenos, também avaliamos a interação da LIC20001 inicialmente com colágeno Tipo I. Conforme mostrado na Figura 24, o fragmento menor desta proteína também interage com este tipo de colágeno. Infelizmente, como o fragmento maior de 72 kDa da LIC20001 sofreu degradação, os resultados com esta proteína foram inconclusivos. No que diz respeito às proteínas LruA (LipL71) e LRR, suas interações com laminina (Tabela 4) também foram confirmadas, embora um sinal relativamente fraco tenha sido observado para LRR. Quanto à proteína LipL41, os dados inicialmente obtidos (Tabela 4) não se confirmaram, uma vez que a proteína não interagiu com nenhuma das três moléculas testadas: fibronectina, fibrinogênio e Fator H. Portanto, trata-se de um “falso positivo”. Por fim, a interação da termolisina (LIC13322) com vitronectina foi confirmada. Como o sinal obtido no WB com sobreposição foi fraco, os dados foram posteriormente confirmados em um ensaio de interação por ELISA. Os resultados destes ensaios estão sumarizados na Tabela 5.

Figura 24- Análise da interação de fibronectina plasmática, laminina, colágeno I, fibrinogênio, vitronectina e FH com as proteínas em estudo por Western blot com sobreposição

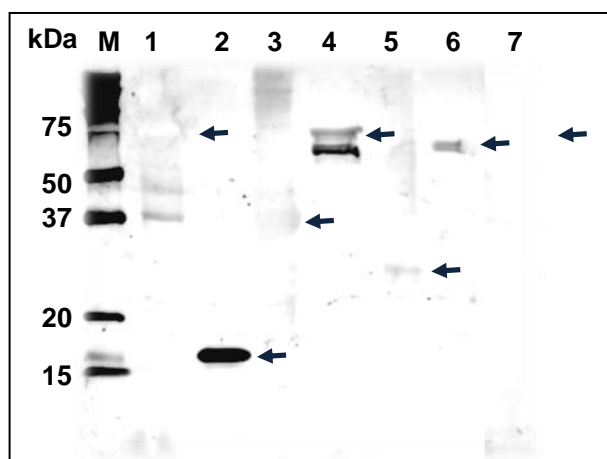
Fibronectina plasmática



M. Marcador

1. Discoidina – fragmento maior (72 kDa)
2. Discoidina – fragmento menor (18,9 kDa)
3. LipL41 (41 kDa)
4. LigAC (62 kDa) – Controle positivo

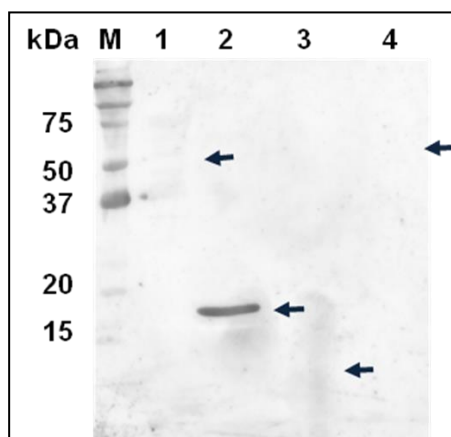
Laminina



M. Marcador

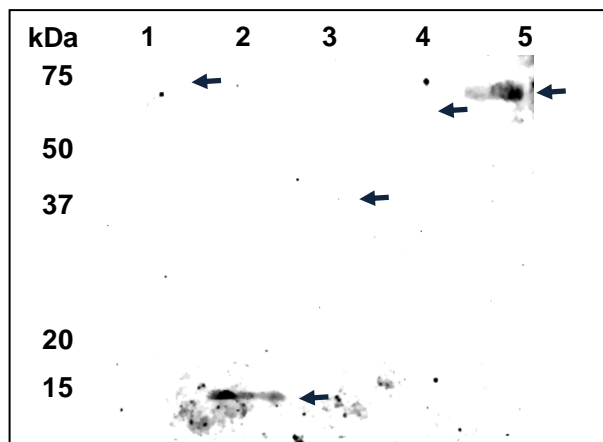
1. Discoidina – fragmento maior (72 kDa)
2. Discoidina – fragmento menor (18,9 kDa)
3. LipL41 (41 kDa)
4. LruA (71 kDa)
5. LRR (30 kDa)
6. LigAC (62 kDa) – Controle positivo
7. BSA (68 kDa) – Controle negativo

Colágeno I



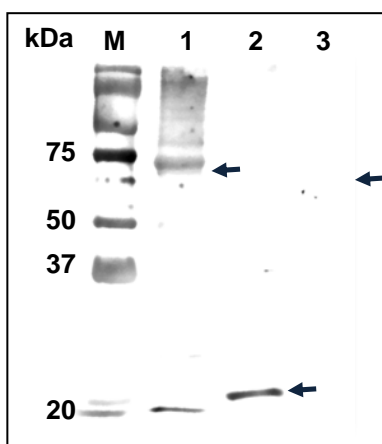
1. Discoidina – fragmento maior (72 kDa)
2. Discoidina – fragmento menor (18,9 kDa)
3. LIC10301 (13 kDa) – Controle negativo
4. BSA (68 kDa) – Controle negativo

Fibrinogênio



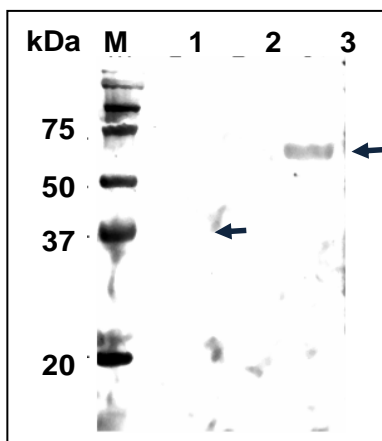
1. Discoïdina-fragmento maior (72 kDa)
2. Discoïdina-fragmento menor (18,9 kDa)
3. LipL41 (41 kDa)
4. BSA (68 kDa) – Controle negativo
5. LigAC (62 kDa) – Controle positivo

Vitronectina



- M. Marcador
1. Termolisina (70 kDa)
 2. LcpA (21 kDa) – Controle positivo
 3. BSA (68 kDa) – Controle negativo

Fator H



- M. Marcador
1. LipL41 (41 kDa)
 2. BSA (68 kDa) – Controle negativo
 3. LigAC (62 kDa) – Controle positivo

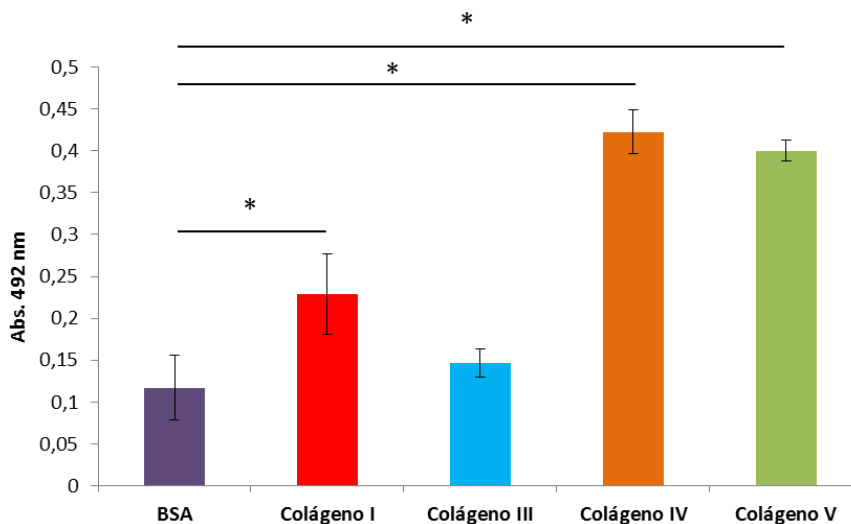
Após eletroforese em condições não redutoras, as proteínas recombinantes foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com as moléculas purificadas (100µg) ou com 10% de soro como fonte de vitronectina ou FH. A detecção foi feita com anticorpos específicos. LigAC (62 kDa) e BSA (68 kDa) foram incluídas como controles positivo e negativo, respectivamente. Fonte: Cárdenas Arias (2018)

Tabela 5– Resumo dos resultados dos ensaios de interação das proteínas em estudo com componentes do hospedeiro.

PROTEÍNA	MOLÉCULA ALVO	INTERAÇÃO
LIC20001	Fibronectina	Sim
	Fibrinogênio	Sim
	Laminina	Sim
LIC11003 (LruA/LipL71)	Laminina	Sim
LIC12901 (Domínio LRR)	Laminina	Sim
LIC12966 (LipL41)	Fibronectina	Não
	Fibrinogênio	Não
	Fator H	Não
	Laminina	Não
LIC3322 (Termolisina)	Vitronectina	Sim

Os ensaios de interação com duas das cinco proteínas em estudo foram um pouco mais aprofundados. A proteína LIC20001, contendo o domínio discoidina, interagiu com colágeno I conforme resultados do “*overlay*” (Figura 24). Com o objetivo de avaliar se esta proteína também se ligaria a outros tipos de colágeno, realizou-se um ELISA em que diversos tipos de colágeno (CI, CIII, CIV e CV) foram imobilizados nas placas e incubou-se, então, com o fragmento menor da LIC20001 (domínio discoidina). A detecção da proteína ligada aos colágenos foi feita com anti-discoidina produzido em coelho e anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase. Conforme observado na Figura 25, o domínio discoidina se liga aos colágenos IV e V, além de se ligar ao colágeno I.

Figura 25– Interação entre LIC20001 (domínio discoidina) e diferentes tipos de colágeno

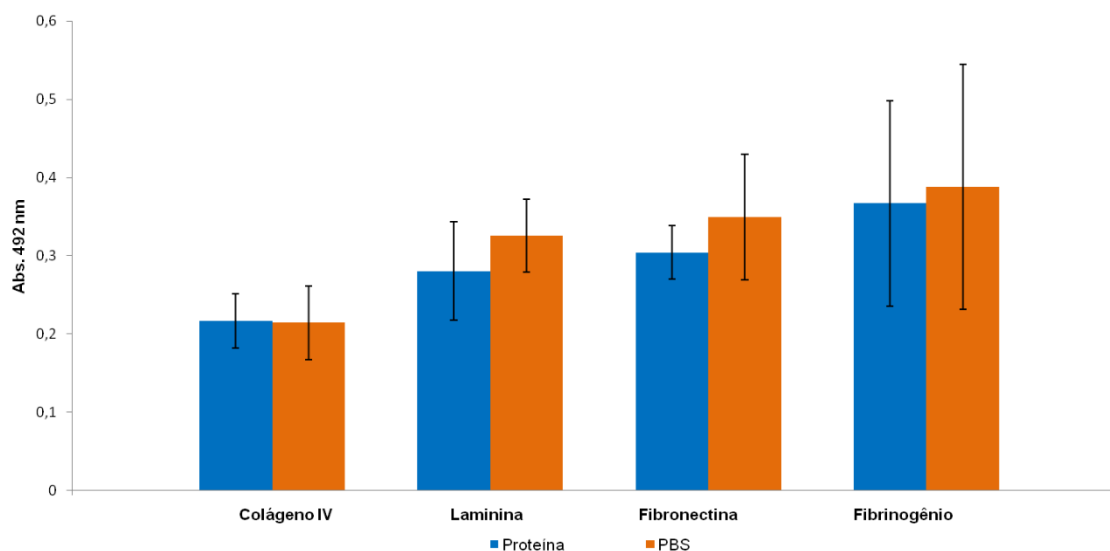


Colágenos I, III, IV e V (10 µg/mL) foram imobilizados em poços de placas de ELISA e a interação com o domínio discoidina (10 µg/mL) foi avaliada. A proteína ligada aos colágenos foi detectada com anti-discoidina produzido em coelho (1:5.000) e anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (1:10.000). Cada barra representa o valor médio de absorbância a 492 nm de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando Student t test. * $p < 0,05$. Fonte: Cárdenas Arias, 2018.

4.9 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ADESÃO DE LEPTOSPIRAS A COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR PELO FRAGMENTO MENOR DA PROTEÍNA LIC20001 (DOMÍNIO DISCOIDINA)

Ensaio de inibição da adesão de leptospiiras a colágenos, bem como a outras moléculas da matriz extracelular, pelo domínio discoidina foram realizados. Embora não significativa estatisticamente, observou-se uma leve inibição da adesão à laminina, fibronectina e fibrinogênio na presença do domínio discoidina (Figura 26). Isso já era esperado uma vez que há outras adesinas na superfície das bactérias descritas por interagirem com estes componentes do hospedeiro.

Figura 26- Adesão da bactéria *Leptospira* aos componentes da matriz extracelular colágeno IV, laminina, fibronectina e fibrinogênio na presença da proteína LIC20001 (domínio discoidina)

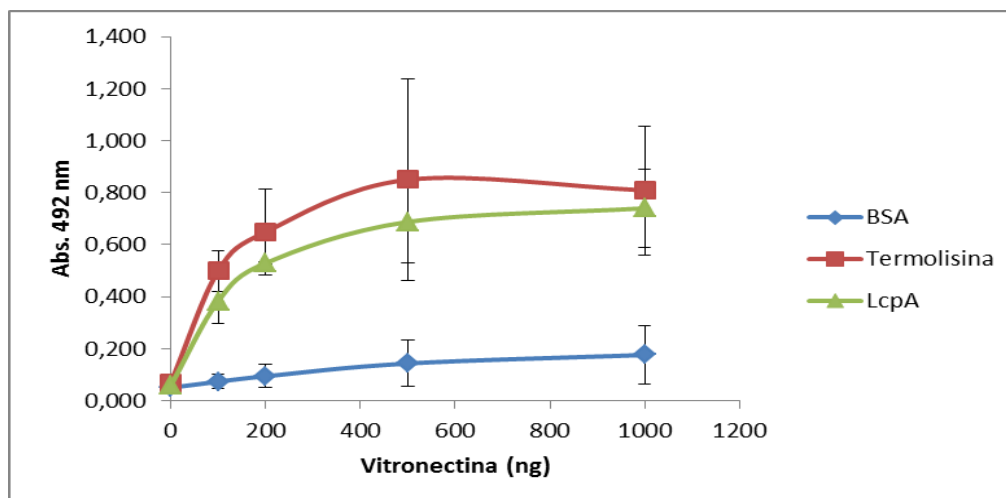


Placas sensibilizadas com componentes de matriz extracelular colágeno IV, laminina, fibronectina e fibrinogênio (1 µg/poço) foram incubadas com 1 µg/poço de LIC20001 (fragmento menor - domínio discoidina) por 1 h e 30 min. Após lavagens, 1×10^8 leptospiras foram adicionadas por poço e as bactérias foram detectadas com o anticorpo policlonal anti-LipL32 (1:5000). Como controle negativo foi usado PBS. Cada barra representa o valor médio da absorvância a 492 nm de três experimentos independentes realizados cada um em duplicata. Student t test. *p < 0,05. Fonte: Cárdenas Arias (2018).

4.10 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA TERMOLISINA COM A MOLÉCULA DE MATRIZ EXTRACELULAR VITRONECTINA POR ELISA

Dados adicionais com a proteína termolisina também foram gerados. Em uma curva de dose-resposta por ELISA, a proteína interagiu com a vitronectina de forma dose-dependente, atingindo saturação quando foram utilizados 500 ng de vitronectina (Figura 27). A proteína LcpA, previamente descrita como uma proteína que se liga à vitronectina (DA SILVA et al., 2015), foi incluída como controle positivo, e BSA foi incluída como controle negativo.

Figura 27- Interação da termolisina com vitronectina.

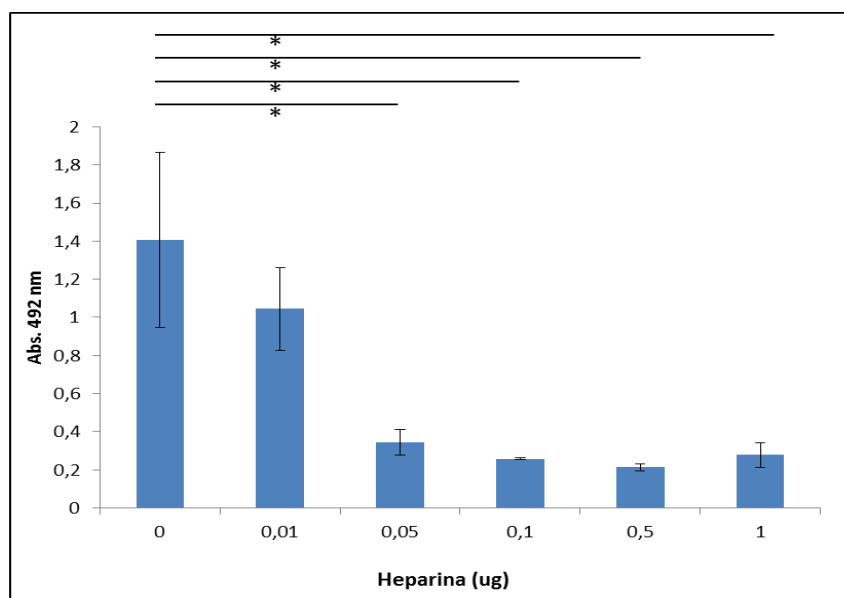


Termolisina, LcpA (controle positivo) e BSA (controle negativo) (1 µg/poço) diluídas em PBS foram imobilizadas em placas de 96 poços e posteriormente incubadas com vitronectina (0- 1000 ng). Após lavagens, os poços foram incubados com anti-vitronectina e anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase, ambos na diluição de 1:5000. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os pontos representam a média e o desvio padrão da absorbância a 492nm de dois experimentos independentes. Fonte: Cárdenas Arias (2018).

4.11 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO À HEPARINA DA VITRONECTINA NA INTERAÇÃO COM A TERMOLISINA.

A vitronectina possui três domínios de ligação à heparina. Como diversos patógenos interagem com esta molécula utilizando esses sítios, avaliamos se eles seriam os responsáveis pela interação da termolisina com vitronectina. Pode-se observar que ocorre uma inibição de forma dose-dependente na presença de heparina (Figura 28). Estes resultados indicam que a termolisina interage com vitronectina através dos seus domínios de ligação à heparina.

Figura 28- Mapeamento dos sítios de interação termolisina/vitronectina.

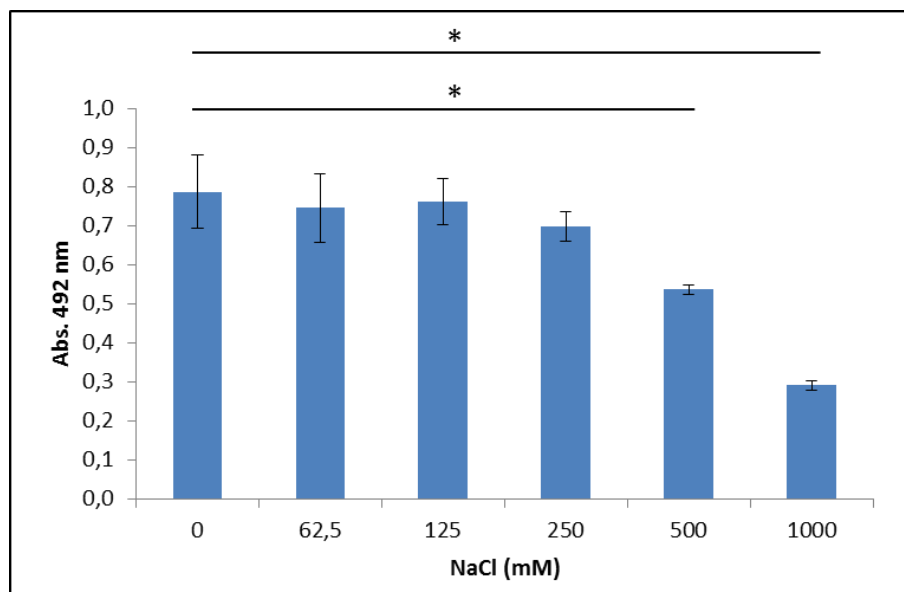


Vitronectina (10 µg/ml) foi adicionada a termolisina imobilizada na presença (0,01 – 1 µg) ou ausência de heparina. A vitronectina ligada foi detectada com um anticorpo específico, e anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase. Cada ponto representa o valor da média de absorvância a 492 nm ± o desvio padrão de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando Student t test. *p < 0,05. Fonte: Cárdenas Arias (2018).

4.12 AVALIAÇÃO DO PAPEL DE FORÇAS IÔNICAS NAS INTERAÇÕES DA TERMOLISINA COM VITRONECTINA HUMANA

No que diz respeito ao papel de forças iônicas, o efeito de NaCl (62,5 a 1000 mM) na ligação de vitronectina (10 µg/ml) à termolisina imobilizada (10 µg/ml) também foi avaliado. NaCl na faixa de 500 a 1000 mM inibiu parcialmente a ligação de termolisina à vitronectina (Figura 29). Os dados sugerem que forças iônicas desempenham um papel nestas ligações.

Figura 29- Papel das forças iônicas na interação termolisina/vitronectina.



Vitronectina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) foi adicionada a termolisina imobilizada na presença (62,5 – 1000 mM) ou ausência de cloreto de sódio. A vitronectina ligada foi detectada com um anticorpo específico, e anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase. Cada ponto representa o valor da média de absorbância a 492 nm \pm o desvio padrão de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando Student *t* test. * $p < 0,05$. Fonte: Cárdenas Arias (2018).

5 DISCUSSÃO

Para obtenção de proteínas de superfície de *Leptospira*, dois métodos foram utilizados (Figura 10). Utilizando-se marcação com biotina, não se obtiveram proteínas em uma quantidade adequada para os ensaios subsequentes. Já no protocolo de extração com o detergente sarcosil, obteve-se uma maior quantidade de proteínas. No ensaio piloto de *Far-Western blot* um maior número de OMPs extraídas com sarcosil interagiu com moléculas do hospedeiro, confirmando a eficiência deste método.

Na primeira etapa do projeto, foram selecionadas as seguintes proteínas como moléculas-alvo do hospedeiro: vitronectina, laminina, fibrinogênio, fibronectina e o regulador do sistema complemento humano, Fator H. Tais moléculas foram imobilizadas em esferas magnéticas e procedeu-se, então, aos ensaios de interação com OMPs de *Leptospira*. Diversas proteínas que interagiram com as moléculas-alvo foram visualizadas por SDS-PAGE, coradas por prata (Figura 20).

Os perfis eletroforéticos mostraram algumas semelhanças, sugerindo que determinadas proteínas possivelmente podem interagir com mais de uma molécula do hospedeiro. Essa hipótese se confirmou após análise dos resultados por espectrometria de massas, em que aparecem proteínas comuns nas interações. No entanto, há também proteínas específicas para cada uma das moléculas.

Conforme esperado, algumas das proteínas identificadas por espectrometria de massas já foram descritas como potenciais adesinas de *Leptospira*. Aí incluem-se LipL32, que se liga a proteínas de matriz extracelular como laminina, colágenos tipo I, IV e V e fibronectina plasmática (HAUK et al., 2008; HOKE et al., 2008), OmpL1, uma OMP descrita por se ligar à matriz extracelular e a plasminogênio (FERNANDES et al., 2012), proteínas da família OmpA (porinas) (CONFER; AYALEW, 2013) e o Fator de Elongação Tu, proteína com funções *moonlighting* envolvida na síntese de proteínas no citoplasma e atuando como receptor de superfície para plasminogênio, Fator H e moléculas da matriz extracelular (WOLFF et al., 2013). Outras proteínas importantes encontradas foram: LipL21, uma OMP expressa durante o processo de infecção e conservada em leptospiros patogênicas (CULLEN et al., 2003), esfingomielinase C, responsável por causar hemólise (BERNHEIMER; BEY, 1986), OprL 1, uma lipoproteína também presente em *Pseudomonas* associada à camada

de peptidoglicano (MATTHIJS et al., 2013) e uma serinoprotease com domínio SppA (TRUEBA; BOLIN; ZUERNER, 1995). Além destas, foram também identificadas proteínas desconhecidas, que podem ser consideradas como candidatas promissoras para novas análises.

A partir dos dados obtidos por espectrometria de massas, foram selecionadas cinco proteínas para serem avaliadas neste projeto. Elas foram produzidas em sistema heterólogo e foram testadas em ensaios funcionais que validaram suas supostas funções. Uma das proteínas escolhidas foi a LIC20001. Esta proteína possui um domínio discoidina, conhecido por se ligar a diversos componentes da matriz extracelular incluindo vários tipos de colágeno (AGARWAL et al., 2002; CARAFOLI; HOHENESTER, 2013; LEITINGER; KWAN, 2006). Do mesmo modo, este domínio está envolvido na adesão a células em outras bactérias (BORZA; POZZI, 2014). Neste trabalho foi confirmada a localização da proteína LIC20001 na membrana da estirpe patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki Fromm por microscopia eletrônica. Não foi observada marcação na estirpe não patogênica *Leptospira biflexa* sorovar Patoc Patoc I, o que está de acordo com dados do genoma de *Leptospira*, atestando a presença do gene que codifica a proteína somente nas leptospiros patogênicas (NASCIMENTO et al., 2004). Considerando que o ensaio piloto apontou que esta proteína interage com fibronectina plasmática, laminina e fibrinogênio, esta interação foi confirmada por *Far Western blot*, quando o domínio discoidina da proteína LIC20001 interagiu com todos os componentes acima descritos, assim como interagiu com colágeno I. Como o fragmento maior da proteína sofreu degradação, não se observou uma interação forte com os componentes alvo neste caso (Figura 24). Conforme relatado acima, o domínio discoidina de proteínas de outras bactérias interage com vários tipos de colágenos. Conseqüentemente avaliamos a interação deste domínio da proteína LIC20001 com diversos tipos de colágeno. Na Figura 25 pode-se observar que o domínio discoidina se liga aos colágenos I, IV e V. O colágeno I é o colágeno mais abundante do corpo humano, presente nos tecidos em processo de cicatrização (sendo o produto final da cicatrização por reparo), encontrado nos tendões, nas cartilagens e na parte orgânica do osso (PARVIZI et al., 2010; RICARD-BLUM, 2011). O colágeno IV desempenha um papel na junção neuromuscular como um organizador pré-sináptico, que funciona como filtro para macromoléculas em órgãos como rins e pulmões; compõe as membranas basais do epitélio e endotélio,

mediante complexas interações inter e intramoleculares, forma redes que fornecem suporte estrutural às células e tecidos e influenciam a adesão; migração e diferenciação celular; é alvo de ligação de vários patógenos (KHOSHNOODI; PEDCHENKO; HUDSON, 2008; PARVIZI et al., 2010; RICARD-BLUM, 2011). O colágeno tipo V é o componente majoritário do tecido intersticial, presente nos ossos e tendões, está associado ao colágeno tipo I e à placenta (PARVIZI et al., 2010; RICARD-BLUM, 2011). Os resultados sugerem que a proteína LIC20001, ao se ligar aos colágenos I, IV e V, poderia funcionar como adesina, mediando a ligação da *Leptospira* a colágenos presentes nas membranas basais do epitélio e do endotélio, assim como à matriz intersticial auxiliando, desta forma, a bactéria na disseminação e colonização de diferentes tecidos. Com o propósito de avaliar a contribuição da proteína LIC20001 na adesão a componentes de matriz extracelular, realizou-se um ensaio de inibição da adesão de leptospiros pelo domínio discoidina às moléculas-alvo (colágeno IV, laminina, fibronectina plasmática e fibrinogênio). Embora os resultados deste ensaio não tenham revelado uma diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle (Figura 26), observa-se uma pequena interferência na adesão da bactéria com laminina, fibronectina e fibrinogênio na presença do domínio discoidina, refletindo um indício da contribuição desta proteína na adesão de leptospiros a moléculas do hospedeiro. O limitado efeito inibitório observado pode ser atribuído à presença de outras adesinas da bactéria que, certamente, participam da ligação da bactéria aos componentes de matriz extracelular avaliados. Inúmeras outras supostas adesinas de *Leptospira* foram descritas como ligantes de componentes da matriz extracelular. Lsa24 se liga a laminina, colágeno tipo I, colágeno tipo IV, e fibronectina (BARBOSA et al., 2006), Lsa21 se liga a laminina, colágeno IV e fibronectina plasmática (ATZINGEN et al., 2008), Lsa46 e Lsa77 se ligam a laminina e plasminogênio (TEIXEIRA et al., 2015), LIC13341 se liga à laminina e ao ácido hialurônico (GHOSH et al., 2018), Lsa25 (LIC13059) e Lsa16 (LIC10879) se ligam a laminina e ao plasminogênio (PEREIRA et al., 2017), LenA se liga a laminina, ao fibrinogênio e ao colágeno tipo IV, a Erp Y-like interage com fibrinogênio (OLIVEIRA et al., 2018), Lsa19 (LIC11122) e Lsa14 (LIC12287) se ligam a laminina e interagem com plasminogênio (FIGUEREDO et al., 2017), Mce interage com laminina, fibronectina, e colágeno IV (COSATE et al., 2016) e Lsa37 (LIC10821) se liga de maneira dose dependente à laminina e interage com plasminogênio (SILVA

et al., 2016). Acredita-se que para leptospiros haja uma redundância de proteínas envolvidas no processo de adesão, conquistado pela contribuição parcial e pequena de múltiplas proteínas de superfície.

Outra proteína estudada neste trabalho foi a LIC11003, conhecida como LruA ou LipL71. Esta proteína, encontrada na membrana interna, no periplasma e na membrana externa de *Leptospira*, está associada à uveíte em equinos, (VERMA et al., 2005). Presente somente em leptospiros patogênicos, esta proteína parece ser um antígeno vacinal promissor e um suposto fator de virulência, contribuindo para a patogênese da bactéria (VERMA et al., 2005; ZENG et al., 2017; ZHANG et al., 2013). LruA/LipL71 possui um domínio rico em lisinas conhecido como LysM, que desempenha um papel importante na virulência de outras bactérias como *Streptococcus suis* (WU et al., 2016). Nossos dados apontam a interação da LruA/LipL71 com laminina (Tabela 4) por *Western blot* com sobreposição (Figura 24). Este é o primeiro relato de uma interação da LruA/LipL71 com uma molécula da matriz extracelular. Futuramente, pretende-se avaliar com outros ensaios funcionais a interação desta proteína com a laminina e explorar se o domínio LysM da proteína é o responsável por essa interação. O domínio LysM foi encontrado em mais de 4.000 proteínas de origem procariótica ou eucariótica (BUIST et al., 2008), está presente em proteínas extracelulares bacterianas, incluindo hidrolases, adesinas e fatores de virulência, como a Proteína A e a autolisina/adesina Aaa de *Staphylococcus aureus* (HIRSCHHAUSEN et al., 2012; MESNAGE et al., 2014), a proteína de superfície envolvida na virulência de *Streptococcus suis*, SS9-LysM. (WU et al., 2016), a autolisina AcmA de *Lactococcus lactis* (STEEN et al., 2005) e a proteína de superfície BB0323 crucial para a infecção em mamíferos e a sobrevivência de *Borrelia burgdorferi* (KARIU et al., 2013). Este domínio também é encontrado em proteínas produzidas por patógenos fúngicos atuando como moduladores da imunidade do hospedeiro (DE JONGE; THOMMA, 2009).

Outra proteína selecionada para estudo foi a LIC12901, uma proteína com repetições ricas em leucina (*Leucine Rich Repeats*, LRR). Em outras bactérias como *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus*, *Yersinia pestis*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri* o domínio LRR está envolvido na mediação da ligação à célula hospedeira, no processo de invasão e na virulência (EVDOKIMOV et al., 2001; FREIBERG et al., 2004; FUJITA, 2002; HARTMAN et al., 1990; LOIMARANTA et al.,

2009; MACHNER et al., 2003; MIAO et al., 1999; REID et al., 2003). Várias proteínas com o domínio LRR têm sido descritas em *Leptospira*. Dados de cristalografia sugerem que tais proteínas possam reconhecer diferentes motivos estruturais de proteínas do hospedeiro e assim, desempenhar funções diferentes e complementares na fisiologia destas bactérias (MIRAS et al., 2015; NITIPAN et al., 2013). Ensaios de microscopia eletrônica mostraram que esta proteína está localizada na superfície da estirpe patogênica *L. interrogans* sorovar Kennewicki Fromm. Marcações não foram observadas na estirpe não patogênica *L. biflexa*, resultados coerentes com informações do genoma indicando que apenas leptospirosas patogênicas possuem o gene que codifica esta proteína (HE et al., 2004). Conforme esperado, a interação da proteína com laminina (Tabela 4) foi confirmada por *Western blot* com sobreposição (Figura 24). É a primeira vez que se relata este tipo de interação para esta proteína. Análises adicionais com o domínio LRR, um domínio versátil e descrito na literatura como mediador de ligações proteína-proteína, envolvido na virulência de diferentes bactérias entre as quais *Listeria monocytogenes* (FREIBERG et al., 2004; MIRAS et al., 2015), fornecerão informações importantes sobre a contribuição desta proteína para a patogênese da leptospirose.

Outra proteína selecionada foi a LipL41, a terceira mais abundante lipoproteína de superfície presente em leptospirosas patogênicas, expressa durante a infecção aguda, presente nos rins (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; KING et al., 2013; SHANG; SUMMERS; HAAKE, 1996). Esta proteína se liga a hemina, uma molécula responsável pela regulação e o armazenamento de ferro. Na porção carboxi-terminal desta proteína existem quatro repetições de tetratricopeptídeos, os quais podem estar envolvidos em interações proteína-proteína (LIN et al., 2013). Curiosamente, a interação da proteína LipL41 com fibronectina, fibrinogênio, laminina e Fator H (Tabela 4) não foi confirmada por *Western blot* com sobreposição (Figura 24). Portanto, podemos inferir, a partir desses resultados, que esta proteína não deve possuir função de adesina.

A quinta proteína estudada foi a LIC13322, uma metaloprotease da família das termolisinas presentes em leptospirosas patogênicas. As termolisinas vêm sendo estudadas pelo nosso grupo, e dados recentes mostram que esta protease degrada moléculas da cascata do complemento, e está envolvida na degradação do fibrinogênio e decorina (AMAMURA et al., 2017; FRAGA et al., 2014). Nos ensaios-

piloto identificou-se uma interação desta proteína com vitronectina humana (Tabela 4). Esta interação foi confirmada por *Western blot* com sobreposição (Figura 24). Ensaios de interação por ELISA demonstraram-se que a proteína se liga a vitronectina de forma dose-dependente, atingindo saturação com 500 ng de vitronectina (Figura 27). Como anteriormente descrito, a vitronectina possui três domínios de ligação à heparina que estão envolvidos na interação com diversos patógenos. Para avaliar se estes domínios de ligação a heparina estariam envolvidos na interação da vitronectina com a termolisina esta interação foi realizada na presença de doses crescentes de heparina, onde observou-se uma inibição dose-dependente (Figura 28). Portanto, a termolisina interage com vitronectina através dos seus domínios de ligação à heparina, como diversos outros patógenos. Para determinar se forças iônicas teriam um papel importante na interação, diferentes concentrações de NaCl foram empregadas. Na Figura 29 pode-se observar que na faixa de 500 a 1000 mM de NaCl a interação entre essas moléculas foi parcialmente abolida. Estes resultados apontam que forças iônicas desempenham um papel nestas ligações.

6 CONCLUSÕES

No presente estudo foram identificadas proteínas de superfície de *Leptospira interrogans*, que podem representar novas adesinas e novos candidatos vacinais. O fato dessas proteínas serem expressas somente em leptospiros patogênicos é sugestivo de um possível papel destas moléculas na virulência da bactéria. Ao interagir com vários componentes da matriz extracelular, é possível que essas proteínas participem de estágios iniciais da infecção e possam ser futuramente explorados como candidatos para novas vacinas. Acredita-se que, neste sentido, este trabalho tenha contribuído para o entendimento dos mecanismos envolvidos na adesão de leptospiros a diferentes componentes do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis **Veterinary Microbiology**, 2010.

AGARWAL, G. et al. Binding of discoidin domain receptor 2 to collagen I: an atomic force microscopy investigation. **Biochemistry**, v. 41, n. 37, p. 11091–8, 17 set. 2002.

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**, v. 8, p. 958, 2017.

ATZINGEN, M. V et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 70, 29 abr. 2008.

AUBRON, C. et al. Efficacy and safety of fibrinogen concentrate in trauma patients--a systematic review. **Journal of critical care**, v. 29, n. 3, p. 471.e11-7, jun. 2014.

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. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of Leptospira spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, 2010.

BERG, H. C.; TURNER, L. Movement of microorganisms in viscous environments. **Nature**, v. 278, n. 5702, p. 349–351, 22 mar. 1979.

BERNHEIMER, A. W.; BEY, R. F. Copurification of Leptospira interrogans serovar pomona hemolysin and sphingomyelinase C. **Infection and immunity**, v. 54, n. 1, p. 262–4, out. 1986.

BORZA, C. M.; POZZI, A. Discoidin domain receptors in disease. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 34, p. 185–92, fev. 2014.

BOYD, N. A.; BRADWELL, A. R.; THOMPSON, R. A. Quantitation of vitronectin in serum: evaluation of its usefulness in routine clinical practice. **Journal of clinical pathology**, v. 46, n. 11, p. 1042–5, 1 nov. 1993.

BUIST, G. et al. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 838–847, maio 2008.

BULACH, D.; ADLER, B. Leptospiral Genomics and Pathogenesis. In: [s.l.: s.n.]. p. 189–214.

CARAFOLI, F.; HOHENESTER, E. Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1834, n. 10, p. 2187–94, out. 2013.

CARVALHO, E. et al. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. **FEBS letters**, v. 583, n. 8, p. 1381–5, 17 abr.

2009.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M. et al. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 6, p. 995–1004, 2012.

CHARON, N. W. et al. The Unique Paradigm of Spirochete Motility and Chemotaxis. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 349–370, 13 out. 2012.

CHARON, N. W.; GOLDSTEIN, S. F. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. **Annual review of genetics**, v. 36, p. 47–73, 2002.

CODEMO, M. et al. Immunomodulatory Effects of Pneumococcal Extracellular Vesicles on Cellular and Humoral Host Defenses. **mBio**, v. 9, n. 2, 10 abr. 2018.

CONFER, A. W.; AYALEW, S. The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. **Veterinary microbiology**, v. 163, n. 3–4, p. 207–22, 3 maio 2013.

COSATE, M. R. et al. Mammalian cell entry (Mce) protein of *Leptospira interrogans* binds extracellular matrix components, plasminogen and β 2 integrin. **Microbiology and Immunology**, v. 60, n. 9, p. 586–598, set. 2016.

CULLEN, P. A. et al. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and immunity**, v. 71, n. 5, p. 2414–21, maio 2003.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 291–318, jun. 2004.

DA SILVA, L. B. et al. Pathogenic *Leptospira* species acquire factor H and vitronectin via the surface protein LcpA. **Infection and immunity**, v. 83, n. 3, p. 888–97, mar. 2015.

DASARI, P. et al. Aspf2 From *Aspergillus fumigatus* Recruits Human Immune Regulators for Immune Evasion and Cell Damage. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1635, 3 ago. 2018.

DE JONGE, R.; THOMMA, B. P. H. J. Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 151–157, abr. 2009.

DE MOERLOOSE, P.; CASINI, A.; NEERMAN-ARBEZ, M. Congenital Fibrinogen Disorders: An Update. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 39, n. 06, p. 585–595, 12 jul. 2013.

ESHGHI, A. et al. *Leptospira interrogans* lpxD Homologue Is Required for Thermal Acclimatization and Virulence. **Infection and immunity**, v. 83, n. 11, p. 4314–21, 1 nov. 2015.

EVDOKIMOV, A. G. et al. Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit 1 Edited by R. Huber. **Journal of Molecular Biology**, v. 312, n. 4, p. 807–821, 28 set. 2001.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis, 2nd edn. Melbourne: MedSci.**

Second ed. Melbourne: MediSci, 1999.

FERNANDES, L. G. V et al. OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. **Infection and immunity**, v. 80, n. 10, p. 3679–92, out. 2012.

FIGUEREDO, J. M. et al. Characterization of two new putative adhesins of *Leptospira interrogans*. **Microbiology**, v. 163, n. 1, p. 37–51, 1 jan. 2017.

FRAGA, T. R. et al. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 6, p. 876–86, mar. 2014.

FRAGA, T. R. et al. *Leptospira* and Leptospirosis. **Molecular Medical Microbiology**, p. 1973–1990, 1 jan. 2015.

FRAGA, T. R.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Leptospirosis: Aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, n. 5, p. 408–419, 1 maio 2011.

FREIBERG, A. et al. Folding and stability of the leucine-rich repeat domain of internalin B from *Listeria monocytogenes*. **Journal of molecular biology**, v. 337, n. 2, p. 453–61, 19 mar. 2004.

FUJITA, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. May, p. 346–353, 2002.

GHOSH, K. K. et al. Evaluation of a novel outer membrane surface-exposed protein, LIC13341 of *Leptospira*, as an adhesin and serodiagnostic candidate marker for leptospirosis. **Microbiology**, v. 164, n. 8, p. 1023–1037, 1 ago. 2018.

GOLDBERG, J. B. et al. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microbiology**, v. 146, n. 10, p. 2495–2508, 1 out. 2000.

HAAKE, D. A. Hamster Model of Leptospirosis. In: **Current Protocols in Microbiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006. v. Chapter 12p. Unit 12E.2.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. **Infection and immunity**, v. 70, n. 9, p. 4936–45, set. 2002.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular microbiology**, 28 jun. 2010.

HALLSTRÖM, T. et al. *Haemophilus influenzae* interacts with the human complement inhibitor factor H. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 1, p. 537–45, 1 jul. 2008.

HAMZEH-COGNASSE, H. et al. Platelets and infections - complex interactions with bacteria. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 82, jan. 2015.

HART, T. et al. Polymorphic factor H-binding activity of CspA protects Lyme borreliae from the host complement in feeding ticks to facilitate tick-to-host transmission. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 5, p. e1007106, 29 maio 2018.

HARTMAN, A. B. et al. Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, ipaH, of *Shigella flexneri*. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 4, p. 1905–15, abr. 1990.

HAUK, P. et al. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infection and immunity**, v. 76, n. 6, p. 2642–50, jun. 2008.

HE, P. et al. Identification and analysis of genes present in *Leptospira interrogans* serovar lai but absent in *L. biflexa* serovar monvalerio. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 36, n. 12, p. 832–9, dez. 2004.

HENDERSON, B. et al. Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 1, p. 147–200, 1 jan. 2011.

HIRSCHHAUSEN, N. et al. Characterization of the modular design of the autolysin/adhesin Aaa from *Staphylococcus aureus*. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e40353, 2012.

HOKE, D. E. et al. LipL32 Is an Extracellular Matrix-Interacting Protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 5, p. 2063–2069, 1 maio 2008.

KARIU, T. et al. Proteolysis of BB0323 results in two polypeptides that impact physiologic and infectious phenotypes in *Borrelia burgdorferi*. **Molecular Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 510–522, maio 2013.

KASSENE, K. et al. Identification of collagenase as a critical virulence factor for invasiveness and transmission of pathogenic leptospira species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 7, p. 1105–1115, 1 abr. 2014.

KATTULA, S.; BYRNES, J. R.; WOLBERG, A. S. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 37, n. 3, p. e13–e21, mar. 2017.

KHOSHNOODI, J.; PEDCHENKO, V.; HUDSON, B. G. Mammalian collagen IV. **Microscopy research and technique**, v. 71, n. 5, p. 357–70, maio 2008.

KING, A. M. et al. Leptospiral outer membrane protein lipL41 is not essential for acute leptospirosis but requires a small chaperone protein, lep, for stable expression. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 8, p. 2768–2776, 2013.

KOVACS-SIMON, A.; TITBALL, R. W.; MICHELL, S. L. Lipoproteins of bacterial pathogens. **Infection and immunity**, v. 79, n. 2, p. 548–61, fev. 2011.

KUNERT, A. et al. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 5, p. 2979–2988, 2007.

Laminin - Structural Proteins | Sigma-Aldrich. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=21735645>>. Acesso em: 15 out. 2018.

LEITINGER, B.; KWAN, A. P. L. The discoidin domain receptor DDR2 is a receptor for type X collagen. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 25, n. 6, p. 355–64, ago. 2006.

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

LI, C. et al. Spirochete Periplasmic Flagella and Motility JMMB Symposium on Spirochete Physiology. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol**, v. 2, n. 4, p. 345–354, 2000.

LIAO, Y.-F. et al. The EIIIA segment of fibronectin is a ligand for integrins alpha 9beta 1 and alpha 4beta 1 providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 17, p. 14467–74, 26 abr. 2002.

LIN, M.-H. et al. LipL41, a hemin binding protein from *Leptospira santarosai* serovar Shermani. **PLoS one**, v. 8, n. 12, p. e83246, 2013.

LOIMARANTA, V. et al. Leucine-rich repeats of bacterial surface proteins serve as common pattern recognition motifs of human scavenger receptor gp340. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 28, p. 18614–23, 10 jul. 2009.

MACHNER, M. P. et al. Aromatic amino acids at the surface of InlB are essential for host cell invasion by *Listeria monocytogenes*. **Molecular microbiology**, v. 48, n. 6, p. 1525–36, jun. 2003.

MALHAS, A. N.; ABUKNESHA, R. A.; PRICE, R. G. Interaction of the leucine-rich repeats of polycystin-1 with extracellular matrix proteins: possible role in cell proliferation. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 13, n. 1, p. 19–26, jan. 2002.

MATTHIJS, S. et al. Evaluation of oprI and oprL genes as molecular markers for the genus *Pseudomonas* and their use in studying the biodiversity of a small Belgian River. **Research in microbiology**, v. 164, n. 3, p. 254–61, abr. 2013.

MESNAGE, S. et al. Molecular basis for bacterial peptidoglycan recognition by LysM domains. **Nature communications**, v. 5, p. 4269, 30 jun. 2014.

MIAO, E. A. et al. *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. **Molecular microbiology**, v. 34, n. 4, p. 850–64, nov. 1999.

MINISTERIO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica / Dados.** Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leptospirose/9805-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 24 out. 2018.

MIRAS, I. et al. Structural characterization of a novel subfamily of leucine-rich repeat proteins from the human pathogen *Leptospira interrogans*. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 71, p. 1351–1359, 2015.

MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. **Journal of Molecular Biology**, v. 260, n. 3, p. 289–298, 19 jul. 1996.

MOSHER, D. **Fibronectin**. [s.l.] Elsevier Science, 1989.

MURRAY, G. L. et al. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. **Molecular microbiology**, v. 78, n. 3, p. 701–9, nov. 2010.

NAKAMURA, S. et al. Direct measurement of helical cell motion of the spirochete *leptospira*. **Biophysical journal**, v. 106, n. 1, p. 47–54, 7 jan. 2014.

NALLY, J. E. et al. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. **Infection and immunity**, v. 73, n. 6, p. 3251–60, jun. 2005.

NARAYANAVARI, S. A. et al. Multiple leptospiral sphingomyelinases (or are there?). **Microbiology (Reading, England)**, v. 158, n. Pt 5, p. 1137–46, maio 2012.

NASCIMENTO, A. L. T. O. et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164–72, abr. 2004.

NITIPAN, S. et al. Identification of epitopes in *Leptospira borgpetersenii* leucine-rich repeat proteins. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 14, p. 46–57, mar. 2013.

OLIVEIRA, T. L. et al. LemA and Erp Y-like recombinant proteins from *Leptospira interrogans* protect hamsters from challenge using AddaVax™ as adjuvant. **Vaccine**, v. 36, n. 19, p. 2574–2580, 3 maio 2018.

PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance. v. 115, n. Pt 20, 15 out. 2002.

PARVIZI, J. et al. Collagen. **High Yield Orthopaedics**, p. 107–109, 1 jan. 2010.

PEREIRA, P. R. M. et al. Multifunctional and Redundant Roles of *Leptospira interrogans* Proteins in Bacterial-Adhesion and fibrin clotting inhibition. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 6, p. 297–310, set. 2017.

PETERSON, C. B. Binding Sites on Native and Multimeric Vitronectin Exhibit Similar Affinity for Heparin: The Influence of Self-Association and Multivalence on Ligand Binding. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 124–131, 1 abr. 1998.

PREISSNER, K. T.; SEIFFERT, D. Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling. **Thrombosis research**, v. 89, n. 1, p. 1–21, 1 jan. 1998.

RADDI, G. et al. Three-dimensional structures of pathogenic and saprophytic *Leptospira* species revealed by cryo-electron tomography. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 6, p. 1299–306, mar. 2012.

RAMARAO, N.; SANCHIS, V. The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review. **Toxins**, v. 5, n. 6, p. 1119–39, 7 jun. 2013.

RAMOS, C. R. R. et al. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 8, p. 1103–1109, ago. 2004.

REID, S. D. et al. Characterization of an extracellular virulence factor made by group A Streptococcus with homology to the Listeria monocytogenes internalin family of proteins. **Infection and immunity**, v. 71, n. 12, p. 7043–52, dez. 2003.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 1, p. a004978, 1 jan. 2011.

ROCA, B. Leptospirosis. **Revista de medicina de la Universidad de Navarra**, v. 50, n. 2, p. 3–6, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning : a laboratory manual (2nd ed)**. Disponível em: <http://trove.nla.gov.au/work/13615226?q&sort=holdings+desc&_=1459343215580&sort=holdings+desc&versionId=180145381>. Acesso em: 30 mar. 2016.

SASAKI, T.; FÄSSLER, R.; HOHENESTER, E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. **The Journal of Cell Biology**, v. 164, n. 7, p. 959–963, 2004.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Guia de vigilância epidemiológica. In: 7ª edição ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. p. 408.

SHANG, E. S.; SUMMERS, T. A.; HAAKE, D. A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic Leptospira species. **Infection and immunity**, v. 64, n. 6, p. 2322–30, jun. 1996.

SILVA, L. P. et al. Evaluation of two novel leptospiral proteins for their interaction with human host components. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 5, p. ftw040, jul. 2016.

SINGH, B.; SU, Y.-C.; RIESBECK, K. Vitronectin in bacterial pathogenesis: a host protein used in complement escape and cellular invasion. **Molecular microbiology**, v. 78, n. 3, p. 545–60, nov. 2010.

STANG, L. J.; MITCHELL, L. G. Fibrinogen. In: [s.l.] Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 181–192.

STEEN, A. et al. AcmA of Lactococcus lactis is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning. **FEBS Journal**, v. 272, n. 11, p. 2854–2868, 13 maio 2005.

STEVENSON, B. et al. Leptospira interrogans endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. **PLoS ONE**, 2007.

STOFFELS, J. M. J.; ZHAO, C.; BARON, W. Fibronectin in tissue regeneration: Timely disassembly of the scaffold is necessary to complete the build. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 22, p. 4243–4253, nov. 2013.

SU, Y.-C.; RIESBECK, K. Vitronectin. **The Complement FactsBook**, p. 351–360, 1 jan. 2018.

- TEIXEIRA, A. F. et al. Features of Two New Proteins with OmpA-Like Domains Identified in the Genome Sequences of *Leptospira interrogans*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0122762, 7 abr. 2015.
- THOMSON, J. J.; PLECHA, S. C.; KRUKONIS, E. S. Ail provides multiple mechanisms of serum resistance to *Yersinia pestis*. **Molecular Microbiology**, 27 set. 2018.
- TRUEBA, G. A.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L. Cloning of the pfaP gene of *Leptospira borgpetersenii*. **Gene**, v. 160, n. 1, p. 133–134, jul. 1995.
- VERMA, A. et al. LruA and LruB, novel lipoproteins of pathogenic *Leptospira interrogans* associated with equine recurrent uveitis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 11, p. 7259–66, nov. 2005.
- VERMA, A. et al. Leptospiral Endostatin-Like Protein A Is a Bacterial Cell Surface Receptor for Human Plasminogen. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 2053–2059, 16 fev. 2010.
- VIEIRA, M. L. et al. **Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions** **FEMS Microbiology Letters**, 2014.
- VIK, D. P. et al. Structure of the murine complement factor H gene. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 32, p. 16720–4, 15 nov. 1988.
- VIK, D. P. et al. Factor H. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 1990a. p. 147–162.
- VIK, D. P. et al. Identification and sequence analysis of four complement factor H-related transcripts in mouse liver. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 6, p. 3193–201, 25 fev. 1990b.
- WANG, Y.; NI, H. Fibronectin maintains the balance between hemostasis and thrombosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 17, p. 3265–3277, 21 set. 2016.
- WEISEL, J. W.; LITVINOV, R. I. Fibrin Formation, Structure and Properties. **Sub-cellular biochemistry**, v. 82, p. 405–456, 2017.
- WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nature Immunology**, v. 2, n. 4, p. 346–352, 1 abr. 2001.
- WOLFF, D. G. et al. Interaction of *Leptospira* elongation factor Tu with plasminogen and complement factor H: a metabolic leptospiral protein with moonlighting activities. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e81818, jan. 2013.
- WOODCOCK, D. M. et al. Nucleic Acids Research Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. **Nucl. Acids Res.**, v. 17, n. 9, p. 3469–3478, 1989.
- WU, Z. et al. A *Streptococcus suis* LysM domain surface protein contributes to bacterial virulence. **Veterinary microbiology**, v. 187, p. 64–9, 1 maio 2016.
- YAMADA, M.; SEKIGUCHI, K. Molecular Basis of Laminin–Integrin Interactions. **Current Topics in Membranes**, v. 76, p. 197–229, 1 jan. 2015.

ZENG, L. et al. A Novel Pan-Genome Reverse Vaccinology Approach Employing a Negative-Selection Strategy for Screening Surface-Exposed Antigens against leptospirosis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 396, 2017.

ZHANG, K. et al. Leptospiral LruA Is Required for Virulence and Modulates an Interaction with Mammalian Apolipoprotein AI. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3872–3879, out. 2013.

ZHANG, L. et al. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. **Molecular Microbiology**, v. 83, n. 5, p. 1006–1023, 1 mar. 2012.

ZHMUROV, A. et al. Mechanism of fibrin(ogen) forced unfolding. **Structure (London, England : 1993)**, v. 19, n. 11, p. 1615–24, 9 nov. 2011.

APÊNDICE I. Proteínas identificadas após as análises por espectrometria de massas utilizando o Software Scaffold (version_4.4.4, Proteome Software Inc., Portland, OR) Foram adotados os seguintes parâmetros no Scaffold: limite de proteína 95%, limite peptídeo 80% e número mínimo de peptídeos.

Proteínas que interagem com fibrinogênio		
Nome	Número de acesso	Massa
Flagellin	A0A098MXF3	31 kDa
Uncharacterized protein	A0A098MYT3	45 kDa
Probable cytosol aminopeptidase	A0A2H1XBI5	54 kDa
Uncharacterized protein (LIC20001)	Q75G12	91 kDa
Signal peptide protein	A0A098MXI3	32 kDa
Sphingomyelinase C	G7QNX2	70 kDa
Membrane protein	A0A098N033	28 kDa
Serine protease	Q72RF2	37 kDa
ATP synthase subunit C S	A0A163R7Z4	10kDa
PhoD-like phosphatase	A0A0E2CNP6	51 kDa
Elongation factor Tu	Q72NF9	44 kDa
Alpha/beta hydrolase	A0A022T215	38 kDa
4Fe-4S dicluster domain protein	A0A2H1XMJ5	113 kDa
Cytochrome C oxidase subunit I	A0A2H1XFF8	59 kDa
Uncharacterized protein	A0A2H1X9H0	26 kDa
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	A0A098MVZ0	32 kDa
Putative electron transfer flavoprotein, alpha	A0A0F6IFK9	33 kDa
ABC transporter ATP-binding protein	A0A2H1XEV9	35 kDa
Uncharacterized protein	A0A098MR89	27 kDa
Hydrogenase	A0A098N1G5	52 kDa
Rod shape-determining protein MreB	A0A098MXP2	37 kDa
Endoflagellar filament sheath protein	A0A098MYX5	35 kDa
Sulfate transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	A0A2H1XC42	37 kDa
ATP synthase subunit alpha	Q72SY1	55 kDa
Ketol-acid reductoisomerase	A0A098MK19	36 kDa
Uncharacterized protein	A0A2H1XKU1	59 kDa
Uncharacterized protein	A0A2H1XA21	33 kDa
Uncharacterized protein	A0A2H1XBH4	28 kDa
Alpha/beta hydrolase	A0A2H1XAB9	40 kDa
Uncharacterized protein	A0A0E2CTS4	33 kDa
Tetratricopeptide repeat protein	A0A2H1XHR0	28 kDa
Uncharacterized protein	A0A2H1XIJ9	29 kDa
Amidase	A0A0C5XD88	21 kDa
RNA polymerase sigma70 factor	A0A098MFJ4	20 kDa
Stage II sporulation protein E	A0A022SWB5	88 kDa
Cysteine synthase	A0A0C5X540	33 kDa
Outer membrane protein (LIC12966)	A0A023PPB4	39 kDa

Proteínas que interagem com fibronectina		
Nome	Número de acesso	Massa molecular
Uncharacterized protein	A0A0E2CTS4	33 kDa
S1/P1 Nuclease	A0A2H1X9G2	33 kDa
Major outer membrane protein (LipL32)	B5AS27	30 kDa
Flagellin	A0A098MXF3	31 kDa
Uncharacterized protein	A0A2H1XA83	17 kDa
Transmembrane outer membrane protein	Q6GXE3	34 kDa
Outer membrane protein (LIC12966)	A0A023PPB4	39 kDa
Signal peptide protein	A0A098MPJ7	36 kDa
OmpA family lipoprotein	Q8F9H3	21 kDa
Probable cytosol aminopeptidase	A0A2H1XBI5	54 kDa
Sphingomyelinase C	G7QNX2	70 kDa
Uncharacterized protein (LIC20001)	Q75G12	40 kDa
Uncharacterized protein	A0A098MYT3	45 kDa
Uncharacterized protein	A0A2H1XIM1	63 kDa
Uncharacterized protein	A0A2H1X9H0	26 kDa
ATP synthase subunit C S	A0A163R7Z4	10kDa
Uncharacterized protein	M3F4F0	5 kDa
DNA primase	A0A0F6HZT4	116 kDa
Alpha-2-macroglobulin family protein	A0A2H1XHA9	218 kDa
Metallo-beta-lactamase domain protein	K8IPW9	10 kDa
ABC transporter ATP-binding protein	A0A0C5X8W9	37 kDa
Methyltransferase small domain protein	A0A0E2D933	86 kDa
Outer membrane protein (OprL) 1	I6R0T4	34 kDa

Proteínas que interagem com laminina		
Nome	Número de acesso	Massa molecular
Signal peptide protein	A0A098MPJ7	36 kDa
Flagellin	A0A098MYA1	31 kDa
Putative lipoprotein	A0A2H1XJD5	24 kDa
S1/P1 Nuclease	A0A2H1X9G2	33 kDa
60 kDa chaperonin	P61438	58 kDa
Signal peptide protein	A0A098MXI3	32 kDa
Uncharacterized protein	A0A098MYT3	45 kDa
Flagellin	A0A098MXF3	31 kDa
4Fe-4S dicluster domain protein	A0A2H1XMJ5	113 kDa
Cytochrome C	A0A2H1XKK6	22 kDa
Uncharacterized protein	A0A2H1X9H0	26 kDa
Lipoprotein (LipL21)	A0A0A7KL61	20 kDa
Probable cytosol aminopeptidase	A0A2H1XBI5	54 kDa
Major outer membrane protein (LipL32)	B5AS27	30 kDa
OmpA family lipoprotein	Q8F9H3	21 kDa
Outer membrane protein (LIC12966)	A0A023PPB4_LEPIR	39 kDa

ATP synthase subunit C S	A0A163R7Z4	10kDa
Uncharacterized protein (LIC20001)	Q75G12	40 kDa
Uncharacterized protein (OmpL1)	A0A098MZU6	35 kDa
Uncharacterized protein	A0A0E2CTS4	33 kDa
PF14346 domain protein (LIC11003)	A0A0E2DB07	62 kDa
Tyrosine recombinase XerD domain protein	M7A6T6	5 kDa
Leucine rich repeat protein (LIC12901)	M6Q272	185 kDa

Proteínas que interagem com vitronectina

Nome	Número de acesso	Massa molecular
Thermolysin metallopeptidase, alpha-helical domain protein (LIC13322)	M3FKJ2	89 kDa
Outer membrane protein (OmpL1)	C9E6H0	34 kDa
Outer membrane lipoprotein	P71435	39 kDa
Major outer membrane protein (LipL32)	B5AS27	30 kDa
Flagellin	A0A098MXF3	31 kDa
S1/P1 Nuclease	A0A2H1X9G2	33 kDa
Signal peptide protein	A0A098MPJ7	36 kDa
Probable cytosol aminopeptidase	A0A2H1XBI5	54 kDa

Proteínas que interagem com Fator H

Nome	Número de acesso	Massa molecular
Outer membrane protein (OmpL1)	C9E6H0_LEPIR	34 kDa
Outer membrane protein (LIC12966)	A0A023PPB4	39 kDa
Major outer membrane protein (LipL32)	B5AS27	30 kDa
Flagellin	A0A098MXF3	31 kDa
S1/P1 Nuclease	A0A2H1X9G2	33 kDa
Signal peptide protein	A0A098MPJ7	36 kDa
Probable cytosol aminopeptidase	A0A2H1XBI5	54 kDa