

**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 parcial

São Paulo

2018.

## 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, leptospiras 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 leptospires 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.

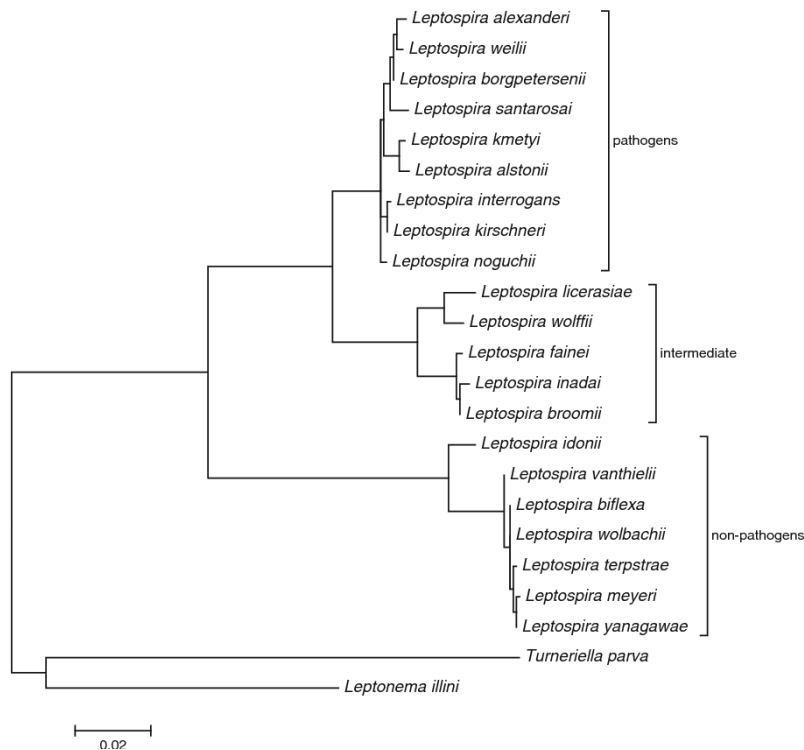
**Key words:** *Leptospira*. Outer membrane proteins. Interaction. Fibronectin. Fibrinogen. Laminin. Vitronectin. Factor H.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A BACTÉRIA LEPTOSPIRA

As leptospiras 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).

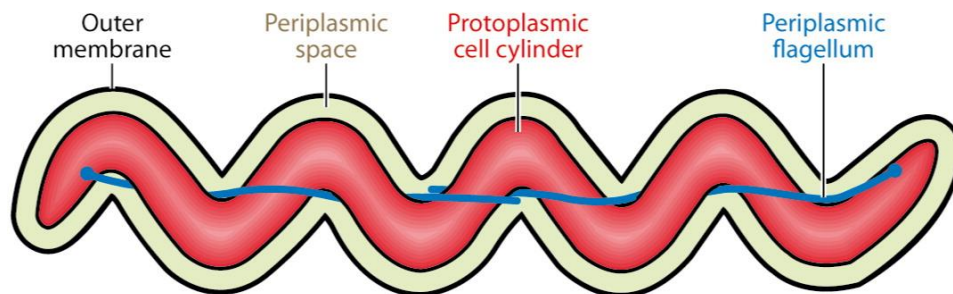
**Figura 1** – Espécies de *Leptospira* agrupadas em três clados



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).

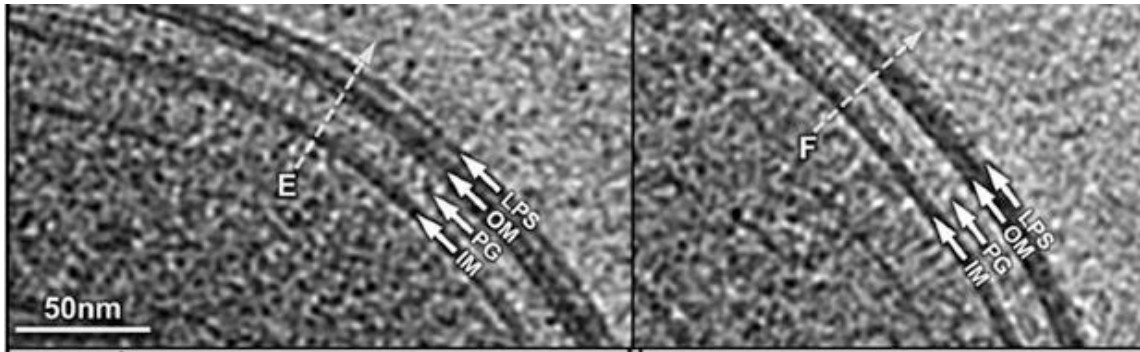
As leptospiras possuem uma estrutura típica de dupla membrana: após a membrana citoplasmática ou interna encontra-se uma camada de peptidoglicanos e logo acima está a membrana externa (Figura 3). Esta é composta principalmente de fosfolípidos, proteínas de membrana externa (OMPs) e de lipopolissacarídeos (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 lípidos), proteínas transmembrana e OMPs periféricas (que estão

associadas à membrana externa). Proteínas transmembrana situadas nas membranas citoplasmáticas bacterianas formam  $\alpha$ -hélices, enquanto aquelas que atravessam a membrana externa formam os chamados  $\beta$ -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 sulfidrílo 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).

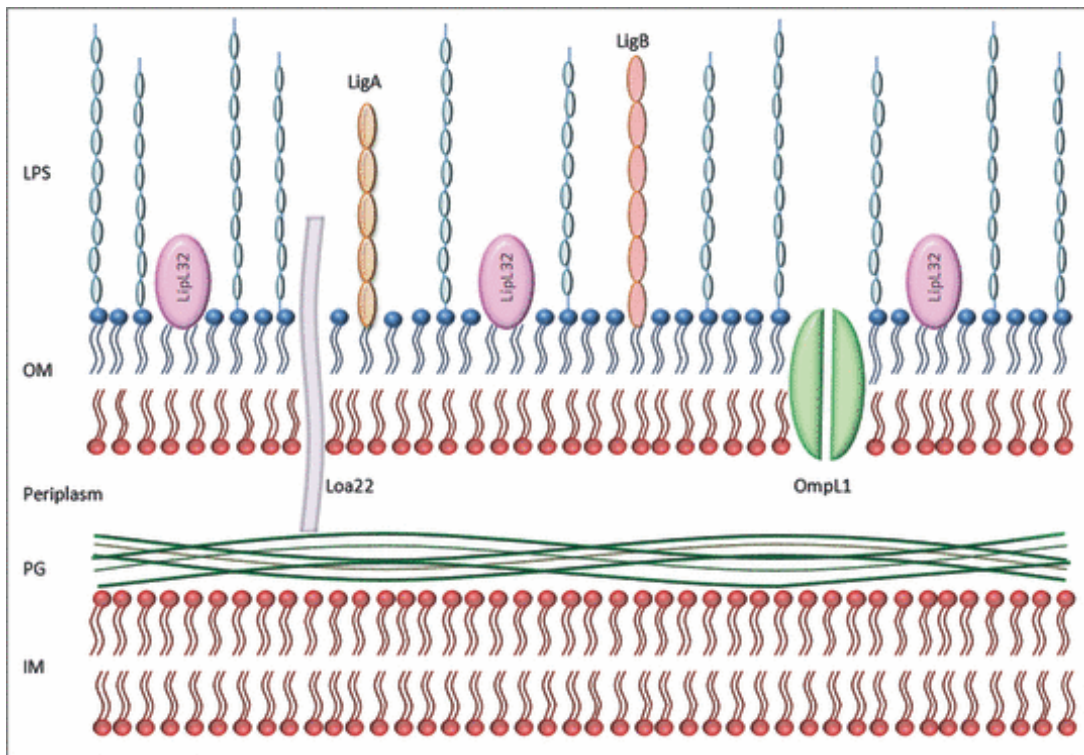


**Figura 3** – Tomografia crio-eletrônica da membra de *Leptospira*.



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 peptideoglicanos (PG) e logo se encontra o espaço periplasmático e a membrana externa (OM). Na OM destacam se as lipoproteínas como a LipL32, 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 mutagenese. 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). Ensaio de tomografia crioeletrônica (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 4* de células humanas, o LPS de *Leptospira* é reconhecido pelo *Toll-like receptor 2* (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 leptospirosas patogênicas 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 leptospirosas patogênicas (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 leptospirosas, 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).

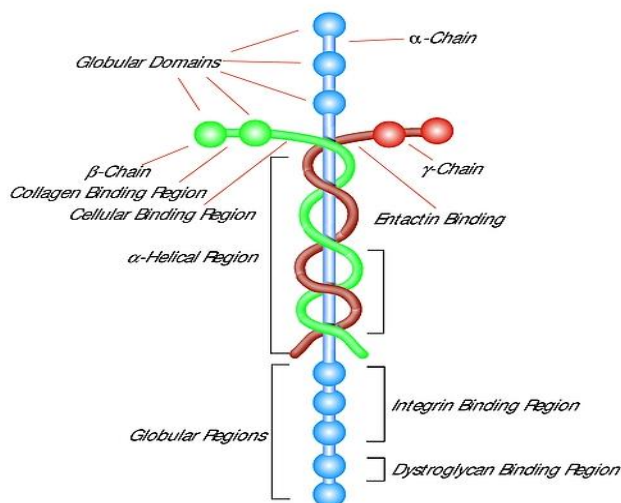
Ainda, foi descrito um grupo de seis proteínas de superfície, denominadas LenABCDEF, as quais possuem domínios *endostatin-like*. Alguns membros dessa família podem se ligar tanto ao regulador do complemento Fator H como ao componente de matriz extracelular laminina do hospedeiro (BARBOSA et al., 2006; 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  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (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  $\alpha$  ( $\alpha$ 1-5), 3 cadeias  $\beta$  ( $\beta$ 1-3) e 3 cadeias  $\gamma$  ( $\gamma$ 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](http://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).

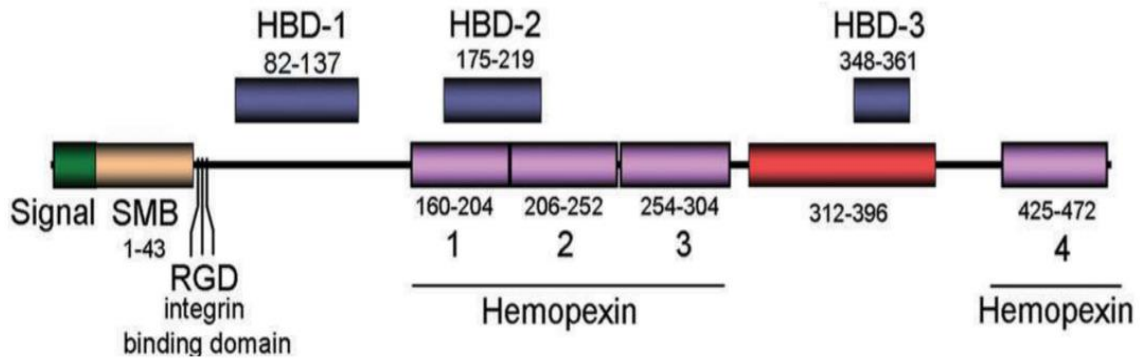
#### 1.4.2 Vitronectina

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.



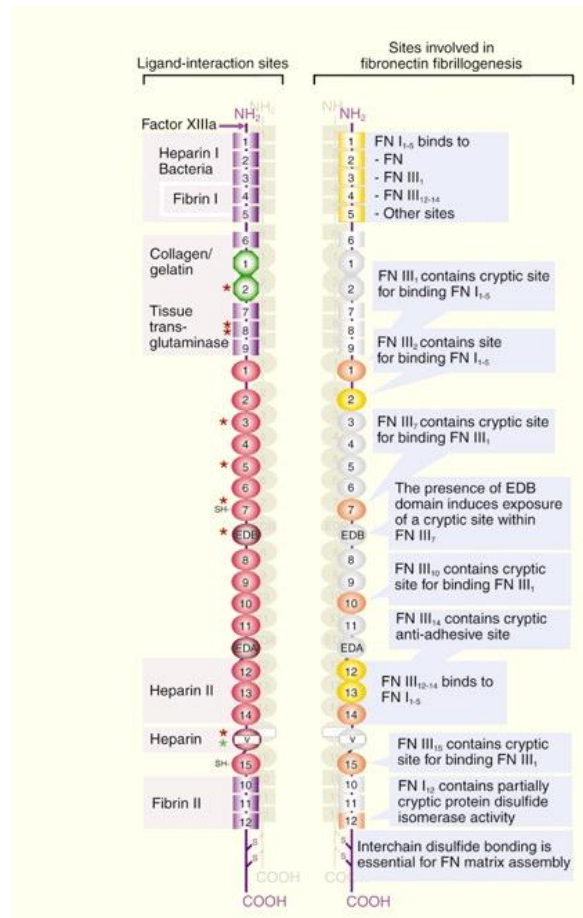
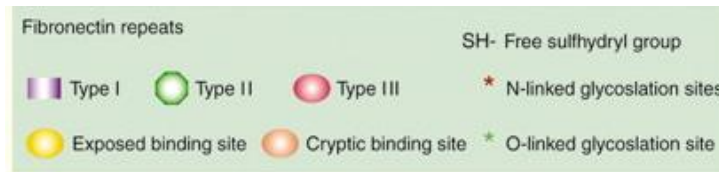
Modelo esquemático da vitronectina contendo um peptídeo sinal (verde), domínio somatomedina B (SMB, amarelo), domínio de ligação a integrina (RGD), domínios hemopexina-like (lilás), domínios de ligação a heparina (HBD, azul) e região de ligação às proteínas E de *H. influenzae* e a proteína A2 de *M.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

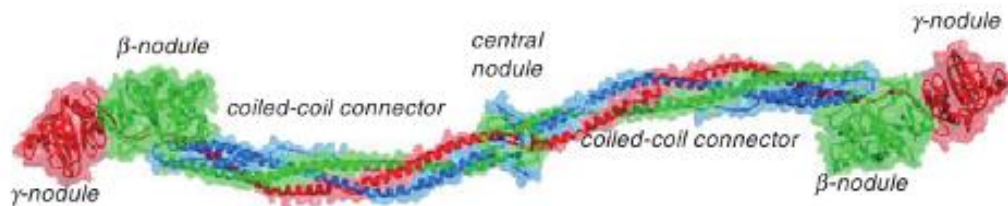
#### 1.4.4 Fibrinogênio

O fibrinogênio é uma glicoproteína homodimérica de 340 kDa. Possui seis cadeias polipeptídicas: 2A $\alpha$ , 2B $\beta$ , e 2 $\gamma$  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.



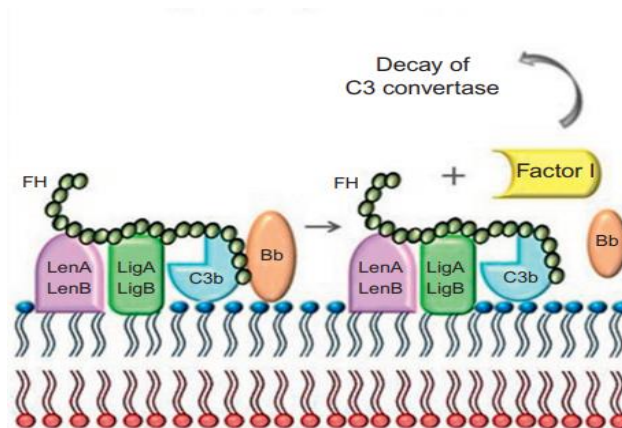
O nódulo central, formado pelas porções N-terminais de todas as seis cadeias, é conectado aos nódulos  $\beta$  e  $\gamma$  distais formados pelas porções C-terminais das cadeias  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente. Fonte: Zhmurov et al. (2011)

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).

### 1.4.5 Fator H

Para sobreviver no hospedeiro, microrganismos patogênicos precisam resistir à ação do sistema imune inato. Para tanto, desenvolveram estratégias sofisticadas para burlar o sistema de defesa de uma variedade de hospedeiros, incluindo a inativação do sistema complemento ou escape ao ataque lítico. Uma das estratégias utilizadas por leptospiros patogênicos para esta finalidade de evasão é a secreção de proteases que clivam a molécula C3, central para a ativação das três vias do complemento, além de inativar proteínas específicas de cada uma das vias, tais como Fator B, C2 e C4b (FRAGA et al., 2014; FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2011). Além da secreção de proteases, outro mecanismo de evasão, é a aquisição de reguladores solúveis do complemento do hospedeiro, como o Fator H (FH), principal regulador da via alternativa. Este regulador é uma proteína plasmática de 155 kDa composta por 20 unidades repetitivas denominadas *Short Consensus Repeats* (SCR) (VIK et al., 1988, 1990b). O FH regula a via alternativa ligando-se ao fragmento C3b, dissociando a C3 convertase C3bBb e servindo como cofator para a clivagem proteolítica de C3b pelo Fator I (Figura 9). Fator H serve para impedir a ativação espontânea na ausência de antígeno e limitar a extensão da ativação do complemento por um invasor exógeno (VIK et al., 1990a).

**Figura 9** - Inativação da via alternativa do complemento por *Leptospira* patogênica pela interação com Fator H.



Leptospiros patogênicos são capazes de inibir a via alternativa do complemento se ligando ao Fator H, que por sua vez atua como cofator na clivagem de C3b pelo Fator I, interrompendo a cascata e impedindo a formação do complexo de ataque a membrana (MAC). Fonte: Fraga 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 leptospirosas patogênicas 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).

## 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.

BRADFORD, M. M.; Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254 maio 1976

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  $\beta 2$  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.

KASSEGNE, 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&\\_id=1459343215580&sort=holdings+desc&versionId=180145381](http://trove.nla.gov.au/work/13615226?q&sort=holdings+desc&_id=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.