

**DANIELLA DOS SANTOS COURROL**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE PAPALISINA DE *LEPTOSPIRA*  
*INTERROGANS***

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Doutora em Ciências**

**SÃO PAULO**

**2023**

**DANIELLA DOS SANTOS COURROL**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE PAPALISINA DE *LEPTOSPIRA*  
*INTERROGANS***

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Doutora em Ciências**

**Área de concentração: Departamento de Microbiologia ICB/USP**

**Orientadora: Profa. Dra. Angela Silva Barbosa**

**Versão original.**

**SÃO PAULO**

**2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

dos Santos Courrol, Daniella  
Produção e caracterização da protease papalisina  
de *Leptospira interrogans* / Daniella dos Santos  
Courrol; orientadora Angela Silva Barbosa. -- São  
Paulo, 2023.  
128 p.

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

1. leptolisina. 2. pappalysin-1 domain protein.  
3. *Leptospira*. 4. atividade proteolítica. 5. matriz  
extracelular. I. Silva Barbosa, Angela,  
orientador. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO DA BANCA

Candidata: Daniella dos Santos Courrol

Título da Tese: Produção e caracterização da protease papalisina *Leptospira interrogans*

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:.....



## CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA - ICB



Instituto  
de Ciências  
Biomédicas  
Excellência em Ensino e Pesquisa

Universidade de São Paulo  
**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Produção e caracterização da protease pappalysin de *Leptospira interrogans*", protocolada sob o CEUA nº 6048190318, sob a responsabilidade de **Angela Silva Barbosa e equipe; Daniella dos Santos Courrol; Monica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 03/09/2018.

We certify that the proposal "Production and characterization of the protease pappalysin from *Leptospira interrogans*", utilizing 1 Lagomorph (1 females), 18 Isogenics mice (18 males), protocol number CEUA 6048190318, under the responsibility of **Angela Silva Barbosa and team; Daniella dos Santos Courrol; Monica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 09/03/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: 24 meses

Depto/Setor: Microbiologia

Origem: Biotério Central do Instituto Butantan

Espécie: Lagomorfo

sexo: Fêmeas

Idade ou peso: 20 a 25 kg

Linhagem: Branco Nova Zelândia

**N amostral:** 1

Origem: Biotério Central do Instituto Butantan

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

Idade ou peso: 20 a 22 g

Linhagem: Balb/C

**N amostral:** 18

São Paulo, 04 de setembro de 2018

Prof. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

## CERTIFICADOS DO COMITÊ DE ÉTICA DO INSTITUTO BUTANTAN



Instituto Butantan de São Paulo  
Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização da virulência da estirpe Manilae knockout para o gene que codifica a protease papalissina de *Leptospira interrogans*", protocolada sob o CEUA nº 6453310521 (01/20216), sob a responsabilidade de **Angela Silva Barbosa** e equipe; Daniella dos Santos Courrol; Luan Gavião Prado - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan de São Paulo (CEUAIB) na reunião de 01/06/2021.

We certify that the proposal "Characterization of the virulence of the strain Manilae knockout for the gene encoding the papalysin protease from *Leptospira interrogans*", utilizing 50 Hamsters (50 males), protocol number CEUA 6453310521 (01/20216), under the responsibility of **Angela Silva Barbosa** and team; Daniella dos Santos Courrol; Luan Gavião Prado - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute of São Paulo (CEUAIB) in the meeting of 06/01/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 07/2021 a 06/2022 Área: Bacteriologia

Origem: Biotério Central

Espécie: Hamsters

sexo: Machos

idade: 21 a 25 dias

Quantidade: 50

Linagem: Siro Dourado

Peso: 40 a 50 g

São Paulo, 28 de março de 2023

Luis Roberto de Camargo Gonçalves  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan de São Paulo

Milene Silva Tino  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan de São Paulo





butantan

## Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Produção e caracterização da protease papalisina de *Leptospira interrogans*", protocolada sob o CEUA nº 4505190318, sob a responsabilidade de **Angela Silva Barbosa** e equipe: *Daniella dos Santos Courrol; Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 11/07/2018.

We certify that the proposal "Production and characterization of the protease pappalysin from *Leptospira interrogans*", utilizing 1 Rabbits (1 females), 18 isogenics mice (18 males), protocol number CEUA 4505190318, under the responsibility of **Angela Silva Barbosa** and team; *Daniella dos Santos Courrol; Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 07/11/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 05/2018 a 04/2020

Área: Bacteriologia

Origem:	Biotério Central			
Espécie:	Coeihos	sexo:	Fêmeas	idade: 60 a 80 dias N: 1
Linhagem:	Branco Nova Zelândia			Peso: 20 a 25 kg
Origem:	Biotério Central			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade: 6 a 8 semanas N: 18
Linhagem:	Balb/c			Peso: 20 a 22 g

Resumo: Espécies patogênicas de *Leptospira* são extremamente eficientes quanto à disseminação e propagação no hospedeiro, fato atribuído à capacidade que possuem de escapar da ação do sistema complemento, primeira linha de defesa da resposta imune inata, e também à capacidade de degradar componentes da matriz extracelular e do plasma humano. A secreção de proteases que inativam proteínas do hospedeiro é uma importante ferramenta utilizada por diversos microrganismos durante o processo de colonização. Os mecanismos subjacentes ao dano tecidual causado por leptospiros patogênicas ainda são pouco conhecidos. Assim como outras bactérias, leptospiros atravessam barreiras epiteliais e endoteliais para ter acesso aos órgãos. Adesão e degradação de componentes da matriz extracelular, principalmente da membrana basal, são certamente necessárias para invasão. Recentemente, nosso grupo avaliou a atividade proteolítica de proteínas presentes no sobrenadante de cultura de duas estirpes de *Leptospira*, uma patogênica (virulenta) e outra saprófita. Os resultados mostraram que proteases presentes apenas no sobrenadante da estirpe virulenta foram capazes de degradar proteoglicanas, fibrinogênio e fibronectina plasmática. Ainda, uma análise do exoproteoma da referida estirpe virulenta permitiu a identificação de algumas proteases, dentre as quais a metaloprotease [pappalysin-1 domain protein] (papalisina) (EKO25673.1). O objetivo deste projeto é produzir e caracterizar funcionalmente a papalisina de *L. interrogans* visando ampliar o conhecimento sobre essas metaloproteases de *Leptospira* nos processos de invasão e evasão imune.

Local do experimento: O experimento será realizado Biotério de Experimentação do Prédio Novo Instituto Butantan e no LETA.

São Paulo, 17 de agosto de 2018



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização do potencial anti-coagulante / hemorrágico da protease papalysina de *Leptospira interrogans*", protocolada sob o CEUA nº 1033050321 (001024), sob a responsabilidade de **Angela Silva Barbosa** e equipe; Daniella dos Santos Courro; Luan Gavião Prado - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan de São Paulo (CEUAIB) na reunião de 30/03/2021.

We certify that the proposal "Characterization of the anticoagulant / hemorrhagic potential of *Leptospira interrogans* papalysin protease", utilizing 18 Heterogenic mice (males or females), protocol number CEUA 1033050321 (001024), under the responsibility of **Angela Silva Barbosa** and team; Daniella dos Santos Courro; Luan Gavião Prado - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute of São Paulo (CEUAIB) in the meeting of 03/30/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 04/2021 a 04/2022 Área: Bacteriologia

Origem: Biotério Central

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Machos ou Fêmeas

idade: 6 a 8 semanas

Quantidade: 18

Linhagem: Swiss

Peso: 25 a 30 g

São Paulo, 28 de março de 2023



Luis Roberto de Camargo Gonçalves  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan de São Paulo



Milene Silva Tino  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan de São Paulo





## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho à minha avó Zilda Coronato Courrol, que sempre acreditou em mim e sempre soube o que dizer para me ajudar.*

## AGRADECIMENTOS

À minha filha, Lorena Courrol Del Negro, obrigada por me ensinar o sentido da vida, do amor, te admiro e tenho muito orgulho de você. E ao meu filho, Thor Courrol Monteiro Gomes, que me ensina a levar a vida com mais humor e alegria, você tem um coração grandioso. Vocês são meus combustíveis, obrigada por me fazerem a pessoa mais feliz desse mundo para seguir em frente.

Ao meu marido Leandro Monteiro Gomes por ser meu refúgio de paz, tranquilidade e equilíbrio, obrigada por me acompanhar nos momentos mais felizes e nos momentos mais difíceis, se dedicar, ser compreensivo e me fazer rir. Sem você nada disso seria possível.

À minha mãe, Maria de Jesus dos Santos Courrol, guerreira, que me ensinou que querer é poder, que me ensinou a cair e levantar e que me ajudou a chegar até aqui.

Ao meu pai, José Luis Courrol, exemplo de bondade e amor. Obrigada por toda ajuda imprescindível para minha formação.

À minha tia Lilia Coronato Courrol na qual sempre me espelhei e quem sempre me incentivou nos estudos e no gosto pela ciência.

À minha tia Lourdes pela força e por tantas vezes cuidar de meus filhos para eu conseguir trabalhar.

À minha orientadora Dra. Angela Silva Barbosa pela confiança, dedicação, paciência, ensinamentos, incentivo, longas conversas, compreensão e amizade. Agradeço e parablenizo pela pessoa e pesquisadora que é!

A Dra. Tatiana Fraga, por me ensinar tudo que sei, pela dedicação, amizade e carinho. Devo demais a você por essa trajetória!

À Dra. Marcia Franzolin por me acolher no Laboratório de Bacteriologia e tornar possível meu desenvolvimento científico. Pelos ensinamentos, pelas colaborações, pelas conversas e risadas.

À Camila Bueno Pacheco por todos os ensinamentos e amizade.

À Dra. Patricia Abreu de Aniz, pelas conversas, ensinamentos, carinho e acolhimento.

Ao Dr. Waldir Elias por me receber no Laboratório de Bacteriologia.

À Dra. Martha Sonobe pelos ensinamentos e companhia. Obrigada pela amizade e pelos momentos de descontração.

À Dra. Rita Ruiz por toda colaboração, ensinamentos e incentivo e junto com o Dr. Marcel me fazer conhecer novos desafios ao organizar o Host Pathogen Interaction Meeting.

À Dra. Cecilia por toda ajuda, ensinamentos, simpatia e atenção.

À minha primeira orientadora, Dra. Lourdes Isaac pelos ensinamentos, colaborações e carinho. E a toda equipe do Laboratório de Sistema Complemento.

À Dra. Ligia Morganti e à Dra. Rosa Chura Chambi por toda ajuda ao longo desses anos e colaboração na renaturação das proteínas.

À Dra. Ludmila Silva, pela amizade, por acreditar em mim e por dedicar e apostar em mim a continuação desse lindo trabalho.

À Matilde Costa pela amizade, pelo exemplo de pessoa que é, pela energia que transforma o laboratório, pelas risadas, carinho, conversas. Sem você nada seria possível, obrigada eternamente.

À Kamila por tudo que me ensinou, por ter me acompanhado logo que comecei a trabalhar no laboratório, sem você eu não teria conseguido chegar aqui.

À Priscila Oliveira pela amizade, companheirismo, ajuda, conversas e pelo exemplo de determinação, que em pouco tempo me conquistou e se tornou uma parceira para todos os momentos.

Ao Dr Luan por toda ajuda nos experimentos com células, por me ensinar a manusear os animais, e principalmente pela amizade, pelas conversas, pelas aventuras e pelo carinho.

À Cassia por toda ajuda no laboratório, por todas conversas, risadas, pela companhia no dia a dia, pelo ombro amigo, por me ouvir mesmo cheia de trabalho para fazer. Obrigada mesmo!

Ao Gabriel Corrêa pela amizade, por toda ajuda, pelas risadas e companheirismo ao longo dos anos.

À Susana Barreto pela ajuda de sempre, pela amizade, pelo carinho, Pelo lindo sorriso que alegra minhas manhãs.

À Mayriele pela amizade, risadas e conversas, sua passagem no laboratório foi rápida, porém muito marcante.

Ao Dr. Roberto Nepomuceno pela ajuda e ensinamentos, e paciência. Tenho muita admiração por você.

À Dra. Fernanda Portaro, Dra. Cristiane Castilho e toda equipe por me ajudar na caracterização bioquímica da leptolisina.

Ao Dr. Marcos Bryan e toda equipe do Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da USP por nos fornecer bactérias e pela colaboração de sempre.

Ao Dr. Benedito Prezotto pelas dicas e pela ajuda nos experimentos de coagulação.

À Dra Mônica pela ajuda na microscopia intravital.

Ao Dr. Rodrigo Rodrigues pela ajuda na caracterização *in silico* da leptolisina.

Ao Dr. Elsio Wunder por toda atenção e pela ajuda na produção da cepa mutante de leptolisina e pelos experimentos com a mesma.

A todo Laboratório de Bacteriologia, aos amigos que nos acompanham no dia a dia e que passaram pelo laboratório deixando sempre um pouco de conhecimento, experiências de vida e sabedoria (Denise, Aline, Julia, Joana, Leticia, Gabriel, Nayara, Claudia Trigo, Claudia Freire, Mirian Dibbo, Bianca, Henrique, Iago, Juliana, Suzy, Daniela Luz, Mirien, Beth, Dirce, Jessica, Tais, Bruna, Bruna Caetano, Paulo, Marina, Dra. Josefa, Dra. Monamaris, Dra Roxane, Angel Marchan, Shiga, Bruno, Fernanda, Paulo Shuroff, Afonso, Josi, Ronaldo, Gabriela, Lidia, e Adriana).

## **AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processos nº2018/09122-5 e 2019/22706-9) pelas bolsas de Mestrado e Doutorado Direto e todo apoio financeiro.

## EPÍGRAFE

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

**Arthur Schopenhauer**

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando a beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”*

**Isaac Newton**



## RESUMO

COURROL, D.S. **Produção e caracterização da protease papalisina de *Leptospira interrogans*** 2023. 128f. Tese. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Espécies patogênicas de *Leptospira* são extremamente eficientes quanto à disseminação e propagação no hospedeiro, fato atribuído à capacidade que possuem de escapar da ação do sistema complemento, primeira linha de defesa da resposta imune inata, e também à capacidade de degradar componentes da matriz extracelular e do plasma humano. A secreção de proteases que inativam proteínas do hospedeiro é uma importante ferramenta utilizada por diversos microrganismos durante o processo de colonização. Os mecanismos subjacentes ao dano tecidual causado por leptospiros patogênicos ainda são pouco conhecidos. Assim como outras bactérias, leptospiros atravessam barreiras epiteliais e endoteliais para ter acesso aos órgãos. Adesão e degradação de componentes da matriz extracelular, principalmente da membrana basal, são certamente necessárias para invasão. Recentemente, nosso grupo avaliou a atividade proteolítica de proteínas secretadas por leptospiros, e uma análise do exoproteoma dessas bactérias permitiu a identificação de algumas proteases, dentre as quais a metaloprotease *pappalysin-1 domain protein*, à qual denominamos leptolisina. Neste projeto produzimos e caracterizamos funcionalmente a leptolisina de *L. interrogans* visando ampliar o conhecimento sobre essa metaloprotease de *Leptospira* nos processos de invasão e evasão imune. Análises *in silico* mostraram que esta protease pertence à categoria das *short pappalysins*, também encontradas em outras bactérias. A leptolisina está presente em todas as espécies de *Leptospira* analisadas, mas é mais conservada entre as espécies patogênicas do subclado P1. Uma caracterização bioquímica preliminar da atividade proteolítica desta protease foi realizada usando peptídeos FRET (*Free Resonance Energy Transfer*). A enzima exibiu atividade máxima em pH 8,0 e 37°C, foi ativa na presença de diferentes sais e fortemente inibida por EDTA e 1,10-fenantrolina. Apresentou acentuada preferência por resíduos de arginina na posição P1. A ação proteolítica da leptolisina recombinante sobre moléculas do hospedeiro foi também avaliada *in vitro* e *in vivo*. A metaloprotease apresentou atividade sobre proteínas da matriz extracelular (proteoglicanas e fibronectina), moléculas da cascata de coagulação (fibrinogênio e trombina) e proteínas efetoras do sistema complemento humano (C2 a C9). Em um modelo de inoculação da proteína em pele dorsal de camundongos, observaram-se hemorragias e degradação de fibronectina extraída da pele. No que diz respeito aos impactos produzidos pela protease na coagulação, plasma humano tratado com doses elevadas da

proteína deixou de coagular. Análises da microcirculação por microscopia intravital (modelo do músculo cremaster) apontaram um aumento no número de leucócitos rolantes na presença de leptolisina, e observou-se agregação leucocitária dependente de tempo. Uma cepa nocaute de leptolisina ( $\Delta lic13434$ ) foi produzida e caracterizada. Esta cepa apresentou menor sobrevivência em soro humano normal (SHN), comparada à cepa selvagem. No entanto, em um modelo de infecção epicutânea em hamsters, não se observou atenuação da virulência com a cepa nocaute, embora a carga bacteriana nos rins destes animais tenha sido inferior àquela observada nos animais inoculados com a cepa selvagem. Por fim, dados com soros de pacientes com leptospirose são sugestivos de que há produção de leptolisina durante infecções naturais por leptospiras patogênicas. A caracterização de toxinas, seus alvos e mecanismos de ação podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para combater a leptospirose.

**Palavras chave:** leptolisina, *pappalysin-1 domain protein*, *Leptospira*, atividade proteolítica, matriz extracelular, sistema complemento, coagulação.

## ABSTRACT

COURROL, D.S. **Production and characterization of the protease pappalysin from *Leptospira interrogans*** 2023. 128f. Thesis. Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, São Paulo University, São Paulo, 2023.

Pathogenic *Leptospira* species are extremely efficient in disseminating in the host, a fact attributed to their ability to escape complement system activation - the first line of defense of the innate immune response - and also to the ability to degrade extracellular matrix and other components of the human plasma. The secretion of proteases that inactivate host proteins is an important tool used by various microorganisms during the colonization process. The mechanisms underlying tissue damage caused by pathogenic leptospires are still poorly understood. Like other bacteria, leptospires cross epithelial and endothelial barriers to gain access to organs. Adhesion to and degradation of extracellular matrix components, especially the basement membrane, are certainly required for invasion. Recently, our group evaluated the proteolytic activity of secreted proteins by leptospires, and exoproteome analyzes of these bacteria allowed the identification of some proteases, including the metalloprotease pappalysin-1 domain protein, which we named leptolysin. In this work we produced and functionally characterized leptolysin from *L. interrogans* in order to expand our knowledge on this metalloprotease from *Leptospira* in the processes of invasion and immune evasion. According to *in silico* analyzes this protease belongs to the category of short pappalysins, also found in other bacteria. Leptolysin is present in all *Leptospira* species, but is more conserved among pathogenic species of the P1 subclade. A preliminary biochemical characterization of its proteolytic activity was performed using FRET (Free Resonance Energy Transfer) peptides. The enzyme exhibited maximum activity at pH 8.0 and 37°C, was active in the presence of different salts and was strongly inhibited by EDTA and 1,10-phenanthroline. It showed a marked preference for arginine residues in the P1 position. The proteolytic activity of recombinant leptolysin on host molecules was also evaluated *in vitro* and *in vivo*. The metalloprotease was active against extracellular matrix proteins (proteoglycans and fibronectin), coagulation cascade molecules (fibrinogen and thrombin) and effector proteins of the human complement system (C2 to C9). In mice dorsal skin leptolysin caused hemorrhages and degradation of skin fibronectin. With regard to the impacts produced by the protease on coagulation, human plasma treated with high doses of the protein failed to clot. Analyzes of the microcirculation by intravital microscopy (cremaster muscle model) showed an increase in the number of rolling leukocytes in the presence of leptolysin, and time-dependent leukocyte aggregation was observed. A

leptolysin knockout strain ( $\Delta lic13434$ ) was produced and characterized. This strain showed lower survival in normal human serum (SHN) compared to the wild-type strain. However, in a model of epicutaneous infection in hamsters, no attenuation of virulence was observed with the knockout strain, although the bacterial load in the kidneys of these animals was lower than that observed in animals inoculated with the wild-type strain. Finally, data with sera from leptospirosis patients suggest that leptolysin is produced during natural infections by pathogenic leptospires. The characterization of toxins, their targets and mechanisms of action can help in the development of strategies to combat leptospirosis.

**Keywords:** leptolysin, pappalysin-1 domain protein, *Leptospira*, proteolytic activity, extracellular matrix, complement system, coagulation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Imagens de leptospiras.....	27
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática da membrana da espiroqueta <i>Leptospira</i> .....	28
<b>Figura 3</b> - Classificação de leptospiras em espécies.....	29
<b>Figura 4</b> - Análise comparativa de papalisinas curtas.....	60
<b>Figura 5</b> - Conservação do domínio catalítico da leptolisina entre espécies de <i>Leptospira</i> .....	61
<b>Figura 6</b> - Análise comparativa do domínio catalítico da leptolisina.....	63
<b>Figura 7</b> - Árvore filogenética construída com base nas sequências das proteínas homólogas aleptolisina.....	65
<b>Figura 8</b> - Clonagem do gene que codifica a leptolisina ( <i>lic13434</i> ).....	66
<b>Figura 9</b> - Análise da expressão e purificação da leptolisina recombinante.....	68
<b>Figura 10</b> - Determinação dos títulos de anti-leptolisina.....	69
<b>Figura 11</b> - Detecção da leptolisina nos sobrenadantes de cultura de diferentes espécies de <i>Leptospira</i> .....	70
<b>Figura 12</b> - Caracterização bioquímica inicial da leptolisina de <i>L. interrogans</i> utilizando o peptídeo Abz-GLARSNL-EDDnp (5 µM) como substrato.....	72
<b>Figura 13</b> - Estudo preliminar das especificidades primárias da leptolisina.....	74
<b>Figura 14</b> - Degradação dose-dependente de proteoglicanas e fibronectina plasmática pela leptolisina de <i>L. interrogans</i> .....	75
<b>Figura 15</b> - Degradação tempo-dependente de proteoglicanas e fibronectina plasmática pela leptolisina de <i>L. interrogans</i> .....	77
<b>Figura 16</b> - Alterações morfológicas induzidas pela leptolisina de <i>L. interrogans</i> em células renais.....	78
<b>Figura 17</b> - Alterações morfológicas induzidas em células renais pela leptolisina purificada e por proteases presentes no sobrenadante de cultura de <i>L. interrogans</i> .....	79
<b>Figura 18</b> - Efeito da leptolisina de <i>L. interrogans</i> sobre a fibronectina secretada pelas células HK-2.....	80

<b>Figura 19</b> - Efeito da leptolisina sobre proteínas das <i>tight junctions</i> de células epiteliais renais humanas HK-2.....	<b>82</b>
<b>Figura 20</b> - Degradação de fibronectina isolada da pele de camundongos inoculados com leptolisina de <i>L. interrogans</i> .....	<b>84</b>
<b>Figura 21</b> - Degradação dose-dependente de moléculas do sistema complemento pela leptolisina.....	<b>86</b>
<b>Figura 22</b> - Degradação tempo-dependente de moléculas do sistema complemento pela leptolisina.....	<b>88</b>
<b>Figura 23</b> - Inibição da atividade proteolítica de moléculas do sistema complemento pela leptolisina.....	<b>89</b>
<b>Figura 24</b> - Degradação de moléculas do sistema complemento por proteases do sobrenadante de <i>L. interrogans</i> Manilae L495 (selvagem e $\Delta lic13434$ ).....	<b>91</b>
<b>Figura 25</b> - Degradação de C3, C4 e C5 séricos pela leptolisina purificada e por proteases do sobrenadante de <i>L. interrogans</i> Manilae L495 (selvagem e $\Delta lic13434$ ).....	<b>92</b>
<b>Figura 26</b> - Sobrevivência de <i>L. biflexa</i> Patoc I em soro humano tratado com leptolisina.....	<b>93</b>
<b>Figura 27</b> - Ensaio de resistência ao soro humano.....	<b>94</b>
<b>Figura 28</b> - Degradação do fibrinogênio e da trombina pela leptolisina.....	<b>96</b>
<b>Figura 29</b> - Efeito da leptolisina sobre a microcirculação por microscopia intravital.....	<b>99</b>
<b>Figura 30</b> - Sobrevivência de hamsters inoculados com <i>L. interrogans</i> Manilae L495 e Manilae L495 $\Delta lic13434$ e avaliação da carga bacteriana nos rins dos animais .....	<b>101</b>
<b>Figura 31</b> - Translocação de cepas de <i>Leptospira</i> através de monocamada de células MDCK.....	<b>102</b>
<b>Figura 32</b> - Detecção de leptolisina em soros de pacientes com leptospirose por ELISA.....	<b>103</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Proteases identificadas no exoproteoma de <i>L. interrogans</i> sorovar Kennewicki estirpe Fromm (LPF).....	<b>31</b>
<b>Tabela 2</b> - Espécies de <i>Leptospira</i> incluídas no alinhamento do domínio catalítico da leptolisina.....	<b>37</b>
<b>Tabela 3</b> - Sorovares de <i>Leptospira</i> usados neste estudo.....	<b>38</b>
<b>Tabela 4</b> - Efeitos das variações nos resíduos na estabilidade do sítio catalítico da leptolisina.....	<b>64</b>
<b>Tabela 5</b> - Atividades específicas e pontos de clivagem produzidos pela leptolisina de <i>L. interrogans</i> nos substratos FRET.....	<b>73</b>
<b>Tabela 6</b> - Tempo de coagulação de plasma humano tratado com leptolisina.....	<b>97</b>
<b>Tabela 7</b> - Sobrevivência de hamsters infectados com leptospiros Manilae L495 e Manilae L495 $\Delta lic13434$ .....	<b>100</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>1.1. LEPTOSPIROSE</b> .....	<b>25</b>
<b>1.2. A BACTÉRIA <i>LEPTOSPIRA</i></b> .....	<b>26</b>
<b>1.3. PAPEL DE PROTEASES SECRETADAS POR LEPTOSPIRAS NO PROCESSO DE INFECÇÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>1.4. <i>PAPPALYSIN-1 DOMAIN PROTEIN</i> (LEPTOLISINA) DE <i>LEPTOSPIRA</i></b> .....	<b>32</b>
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>34</b>
<b>2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>34</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1. ANÁLISES <i>IN SILICO</i></b> .....	<b>35</b>
<b>3.1.1. Previsão de sítios de ligação a metais e substratos</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1.2. Modelagem da estrutura tridimensional da proteína leptolisina</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1.3. Comparação da leptolisina com outras metaloproteases contendo domínio papalisina da família M43B</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1.4. Avaliação da conservação da proteína leptolisina nas espécies do gênero <i>Leptospira</i></b> .....	<b>36</b>
<b>3.1.5. Predição da estabilidade do sítio catalítico da leptolisina em leptospiras do subclado P1, P2 e S</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2. PRODUÇÃO DA LEPTOLISINA RECOMBINANTE E DETECÇÃO DA PROTEÍNA NATIVA</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2.1. Sorovares</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2.2. Clonagem do gene que codifica a leptolisina de <i>Leptospira interrogans</i></b> .....	<b>39</b>
<b>3.2.3. Sequenciamento</b> .....	<b>41</b>
<b>3.2.4. Expressão e purificação da leptolisina de <i>L. interrogans</i></b> .....	<b>41</b>
<b>3.2.5. SDS-PAGE (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrilamye gel eletrophoresis</i>)</b> .....	<b>42</b>
<b>3.2.6. Produção de soro policlonal contra a leptolisina em coelho</b> .....	<b>43</b>
<b>3.2.7. Detecção da leptolisina no sobrenadante de cultura de <i>Leptospira</i> por Western blot</b> .....	<b>44</b>
<b>3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA LEPTOLISINA</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3.1. Ação da leptolisina recombinante sobre substratos FRET (<i>Free Ressonance Energy Transfer</i>)</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3.2. Determinação dos pontos de hidrólise e da atividade específica da leptolisina sobre substratos FRET</b> .....	<b>46</b>

3.3.3. Atividade proteolítica da leptolisina de <i>L. interrogans</i> sobre componentes da matriz extracelular e do plasma.....	47
3.3.4. Atividade proteolítica da leptolisina de <i>L. interrogans</i> sobre células renais HK-2.....	48
3.3.5. Atividade proteolítica da leptolisina de <i>L. interrogans</i> <i>in vivo</i> .....	50
3.3.6. Atividade proteolítica da leptolisina de <i>L. interrogans</i> sobre componentes do sistema complemento humano.....	51
3.3.7. Sobrevivência de <i>Leptospira biflexa</i> em SHN tratado com leptolisina.....	52
3.3.8. Sobrevivência de <i>L. interrogans</i> Manilae L495 (selvagem e $\Delta lic13434$ ) em SHN.....	53
3.3.9. Atividade proteolítica da leptolisina de <i>L. interrogans</i> sobre componentes da cascata de coagulação.....	53
3.4. AÇÃO DA LEPTOLISINA NA COAGULAÇÃO E NA INFLAMAÇÃO.....	53
3.4.1. Ação da leptolisina de <i>L. interrogans</i> no tempo de coagulação utilizando o método de tromboelastometria rotacional.....	53
3.4.2. Ação da leptolisina sobre a microcirculação por microscopia intravital.....	54
3.5. CARACTERIZAÇÃO DA CEPA NOCAUTE PARA LEPTOLISINA ( <i>L. INTERROGANS</i> MANILAE L495 $\Delta lic13434$ ).....	55
3.5.1. Obtenção da cepa nocaute.....	55
3.5.2. Infecção de hamsters.....	55
3.5.3. Ensaio <i>in vitro</i> de translocação por monocamadas polarizadas de células MDCK.....	56
3.5.4. Avaliação da carga bacteriana nos rins por PCR quantitativa em tempo real.....	56
3.6. AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LEPTOLISINA EM AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM LEPTOSPIROSE.....	57
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
4.1. ANÁLISES <i>IN SILICO</i> .....	58
4.1.1. Análises comparativas.....	58
4.1.2. O domínio catalítico da leptolisina é altamente conservado entre espécies patogênicas de <i>Leptospira</i> .....	61
4.2. PRODUÇÃO DA LEPTOLISINA RECOMBINANTE.....	65
4.2.1. Clonagem do gene que codifica a leptolisina.....	65
4.2.2. Expressão e purificação da leptolisina.....	66
4.3. DETECÇÃO DA LEPTOLISINA NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE LEPTOSPIRA.....	68
4.3.1. Produção de soro policlonal contra a leptolisina em coelho e determinação do título de anticorpos.....	68

4.3.2. Detecção da leptolisina no sobrenadante de cultura de leptospira.....	69
4.4. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA LEPTOLISINA DE <i>L. INTERROGANS</i> POR FRET.....	70
4.4.1. Caracterização bioquímica: efeito do pH, concentração de sal, Temperatura e ibidores.....	70
4.4.2. Análise dos sítios de clivagem e das atividades específicas.....	73
4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA LEPTOLISINA SOBRE MOLÉCULAS DA MATRIZ EXTRACELULAR <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> .....	74
4.5.1. Degradação de proteoglicanas e de fibronectina.....	74
4.5.2. Alterações morfológicas nas células HK-2 induzidas pela leptolisina de <i>L. interrogans</i> .....	78
4.5.3. Efeito proteolítico da leptolisina de <i>L. interrogans in vivo</i> .....	83
4.6. AÇÃO DA LEPTOLISINA DE <i>L. INTERROGANS</i> SOBRE O SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO.....	85
4.6.1. Degradação de proteínas do sistema complemento.....	85
4.6.2. Sobrevivência de leptospiras em soro humano tratado com leptolisina.....	92
4.6.3. Sobrevivência de leptospiras (selvagem e nocaute para leptolisina) em soro humano normal.....	93
4.7. AÇÃO DA LEPTOLISINA NA COAGULAÇÃO E NA INFLAMAÇÃO.....	95
4.7.1. Degradação de fibrinogênio e trombina.....	95
4.7.2. Efeito da leptolisina no tempo de coagulação.....	96
4.7.3. Ação da leptolisina sobre a microcirculação por microscopia intravital.....	97
4.8. CARACTERIZAÇÃO DA CEPA NOCAUTE PARA LEPTOLISINA ( $\Delta LIC13434$ ).....	99
4.8.1. Sobrevivência de hamsters infectados com a cepa nocaute ( $\Delta lic13434$ ).....	99
4.9. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LEPTOLISINA EM SORO DE PACIENTES COM LEPTOSPIROSE.....	103
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>104</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>110</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, que atinge principalmente regiões tropicais como o Caribe, Sudeste Asiático, Oceania, América do Sul e Central (HARTSKEERL et al., 2011). No Brasil a doença é endêmica e em períodos de chuva constante se torna epidêmica, principalmente em capitais e regiões metropolitanas. O *Rattus norvegicus* é o principal reservatório urbano das bactérias leptospiras, que são excretadas pela urina contaminando solos úmidos e água. Nos roedores a infecção é crônica e assintomática, e as bactérias colonizam os túbulos renais proximais. Em outros mamíferos, incluindo animais domésticos e rebanhos, a doença pode se manifestar causando abortos em bovinos e uveítes em equinos. Em seres humanos as manifestações clínicas são variáveis e a gravidade depende de fatores como o sorotipo de *Leptospira* infectante, idade, condições de saúde e sistema imunológico do portador (ADLER et al., 2010). Na maioria dos casos o quadro da doença é brando ou moderado. Os principais sintomas são: febre (90% dos casos), mialgia (83%), cefaleia (44%), dor na panturrilha (59%), vômitos (50%) e icterícia (50%) (BRASIL, 2016). No entanto, cerca de 10% dos indivíduos acometidos evoluem para formas graves apresentando hemorragias pulmonares e/ou problemas renais que podem culminar em falência destes órgãos. Nesses casos são realizadas ventilação mecânica ou hemodiálise como terapia de suporte.

A apresentação clínica da doença é bifásica: a fase aguda ou septicêmica dura uma semana aproximadamente, e precede a fase imune, com a produção de anticorpos e excreção de leptospiras pela urina. Nesta fase, pode haver internalização das leptospiras nos tecidos, havendo complicações. Na fase de bacteremia o diagnóstico é feito a partir de leptospiras isoladas do sangue, urina ou líquido cérebro espinhal, por cultivo em meio líquido ou PCR. Na transição da fase aguda para a fase imune, o diagnóstico pode ser feito por ELISA IgM ou *dipstick* utilizando antígenos, extrato de leptospiras ou proteínas (LipL32, LigA e OmpL1). Na fase imune, o diagnóstico conhecido como o “gold standard”

pela Organização Mundial da Saúde é o teste de aglutinação microscópica (MAT), onde são utilizados vários sorovares como antígenos. Neste exame coleta-se soro do paciente com intervalo de 2 semanas e observa-se aglutinação em microscópio de campo escuro, quando há reação antígeno-anticorpo. Se os títulos de anticorpos aumentarem 4 vezes ou mais, o resultado é considerado positivo (revisado por FRAGA et al., 2011).

Em todo o mundo estimam-se aproximadamente 1.000.000 de casos de leptospirose humana e 58.900 mortes por ano. Homens entre 20 e 49 anos representam a maioria dos casos, uma vez que estão mais expostos a atividades ocupacionais e peridomiciliares tipicamente associadas ao sexo masculino. Aí incluem-se trabalhadores da rede de esgotos e de abatedouros, estivadores e lavradores (COSTA et al., 2015).

Entre os anos de 2016 e 2021 foram registrados 20.743 casos no Brasil, com uma média de 4.721 casos anuais e 1.304 óbitos registrados (BRASIL, 2021). Em nosso país, a maior parte das infecções ocorre em áreas urbanas (57%), com prevalência em ambientes peridomiciliares (42%), seguido do ambiente de trabalho (17,5%) e lazer (6%) (BRASIL, 2016). Trata-se de uma doença de notificação compulsória, ou seja, todas as ocorrências, tanto isoladas como surtos, têm que ser notificadas para a vigilância epidemiológica e controle (BRASIL, 2014).

O tratamento para a leptospirose pode ser feito com alguns tipos de antibióticos, que dependem da gravidade da doença. Em casos de doença leve, são administrados eritromicina ou doxiciclina 100 mg duas vezes ao dia durante sete dias. Em casos mais graves é administrada a penicilina G intravenosa a cada 6 horas durante 7 dias.

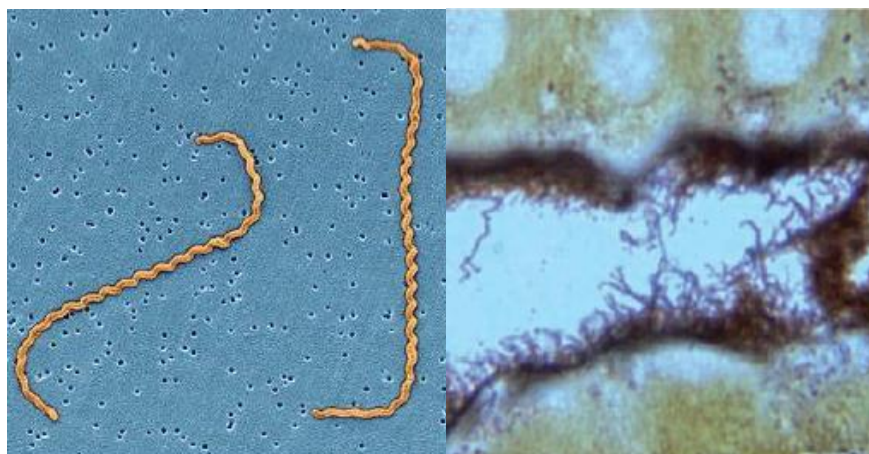
## 1.2. A BACTÉRIA *LEPTOSPIRA*

O gênero *Leptospira* pertence à família *Leptospiraceae*, ordem *Spirochaetales* (FAINE et al., 1999). São bactérias Gram-negativas com aproximadamente 0,15 µm de diâmetro e 6 a 20 µm de



comprimento. São helicoidais, finas, possuem alta motilidade, dois flagelos no espaço periplasmático que conferem movimentos de rotação e translação, e extremidades em forma de gancho (Figura 1).

**Figura 1.** Imagens de leptospiros



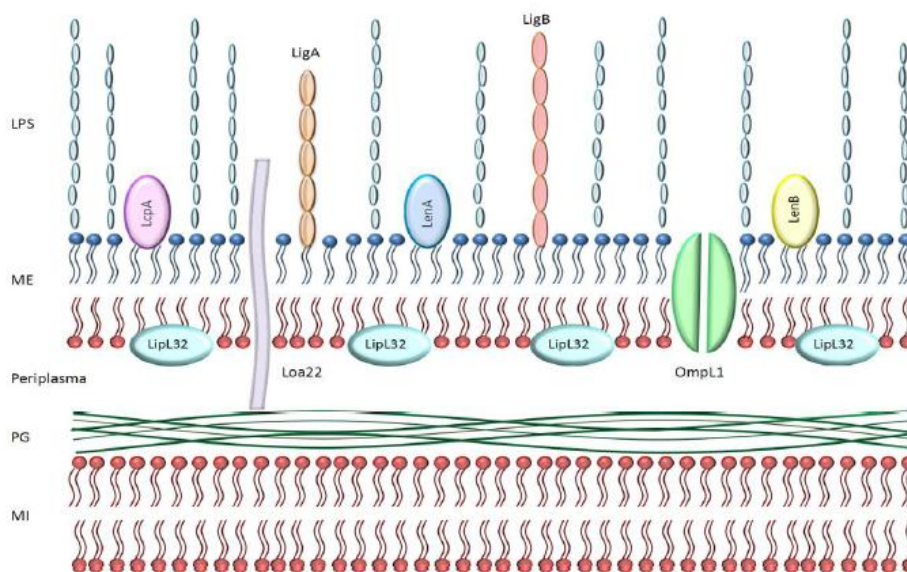
(A) Imagem captada por microscopia eletrônica de *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae. (B) Fotomicrografia de uma secção de tecido renal de *Rattus norvegicus*. As leptospiros encontram-se no lúmen dos túbulos renais proximais como estruturas filamentosas impregnadas por prata; coloração de Warthin-Starry (aumento de 400 x).

Fonte: LEVETT, 2001; KO et al., 2009.

Leptospiros possuem uma membrana citoplasmática, uma fina camada de peptidoglicanos justaposta à membrana interna e uma membrana externa com lipoproteínas e porinas, que permitem a troca de solutos entre o espaço periplasmático e o meio ambiente (Figura 2). Os alcoóis e ácidos graxos são utilizados como fonte de carbono e energia (FAINE et al., 1999; KO et al., 2009). O lipopolissacarídeo presente na membrana externa das leptospiros possui composição semelhante ao de outras bactérias Gram negativas, mas com baixa atividade endotóxica. Os anticorpos dirigidos contra o LPS conferem proteção contra a doença, mas não induzem memória imunológica de longa duração. Portanto, as vacinas utilizadas no ramo veterinário, baseadas em bacterinas, devem ser administradas semestral ou anualmente. As leptospiros podem sobreviver semanas ou até meses em solo úmido e

água. Para sobreviver agregam-se e formam biofilmes (RISTOW et al., 2008). Têm seu crescimento ótimo *in vitro* em temperaturas de 28 a 30°C.

**Figura 2.** Representação esquemática da membrana da espiroqueta *Leptospira*

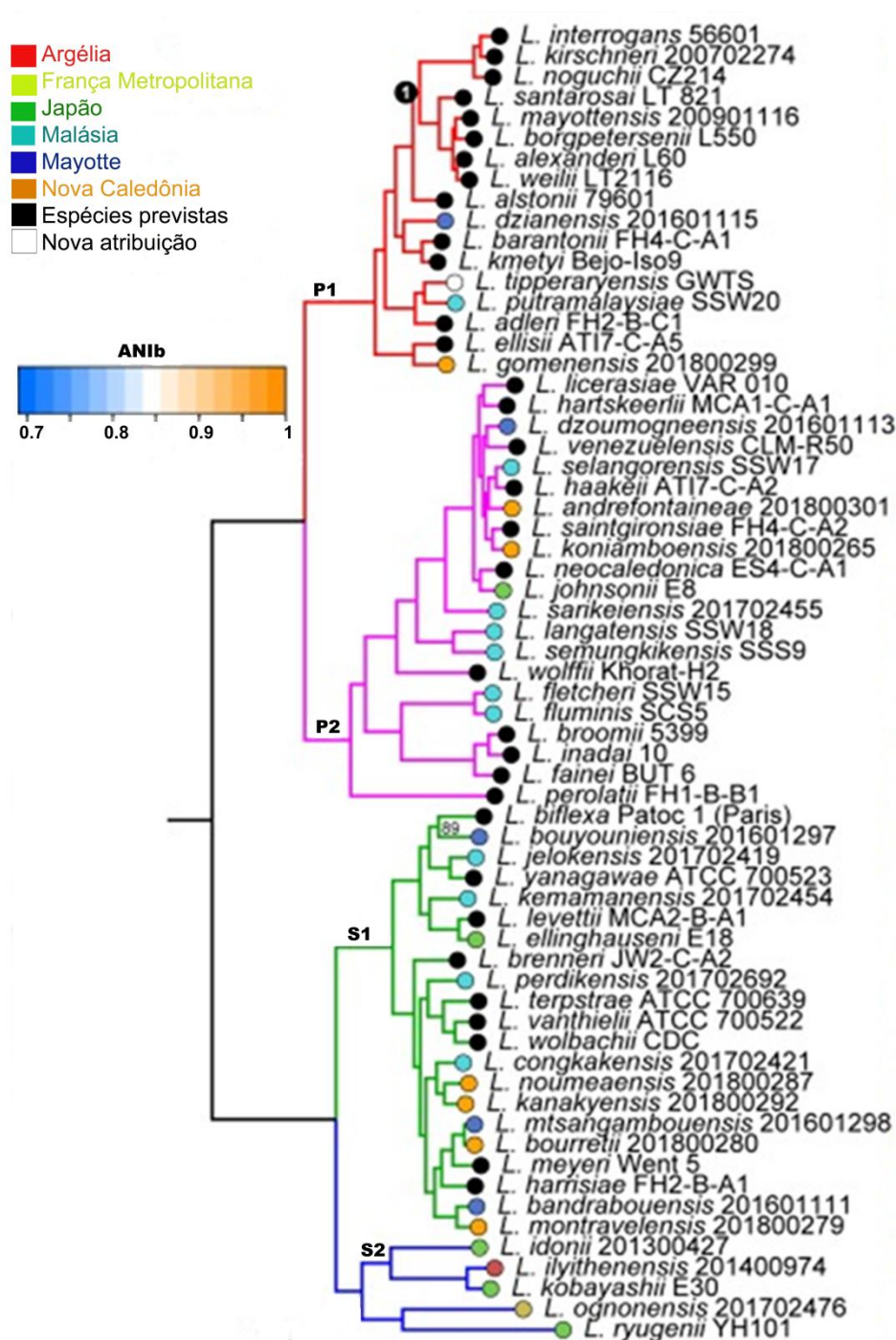


Nesta representação esquemática pode-se notar que a camada de peptidoglicanos (PG) está intimamente associada à membrana interna (MI), a qual está separada da membrana externa (ME) pelo espaço periplasmático, onde se localizam os endoflagelos (não representados na Figura). Dentre os componentes da ME da bactéria, destacam-se os lipopolissacarídeos (LPS), proteínas transmembrana como a porina OmpL1, e diversas proteínas expostas na superfície como LigA, LigB, LenA, LenB, LcpA e Loa22. A lipoproteína LipL32, bastante abundante, é representada como uma proteína de sub-superfície.

Fonte: FRAGA et al., 2011.

Atualmente, o gênero *Leptospira*, compreendendo 66 espécies, é dividido em dois clados subdivididos em 4 subclados: o subclado P1 compreende as espécies patogênicas, o P2 as espécies conhecidas como “intermediárias” (virulência ainda não bem definida), e os subclados S1 e S2 englobam espécies saprófitas (Figura 3) (VINCENT et al., 2019; CAIMI E RUYBAL, 2020; CASANOVAS-MASSANA et al., 2020).

**Figura 3.** Classificação de leptospiros em espécies



Sessenta e quatro espécies de *Leptospira*, agrupadas em quatro subclados distintos (P1, P2, S1 e S2) estão representadas. Duas novas espécies foram descritas após 2019, totalizando 66 espécies até então.

Fonte: VINCENT et al., 2019. Adaptado por Daniella Courrol.

### 1.3. PAPEL DE PROTEASES SECRETADAS POR LEPTOSPIRAS NO PROCESSO DE INFECÇÃO

Espécies patogênicas de *Leptospira* são extremamente eficientes quanto à disseminação e propagação no hospedeiro, fato atribuído à alta motilidade, à capacidade que possuem de escapar da atividade bactericida exercida pelo sistema complemento, primeira linha de defesa da resposta imune inata, e também à capacidade de degradar componentes da matriz extracelular e do plasma, como proteoglicanas, fibronectina plasmática e fibrinogênio (FRAGA et al., 2014; da SILVA et al., 2018). Essas estratégias contribuem para os processos de invasão e evasão imune da bactéria dentro do hospedeiro.

A secreção de proteases que inativam proteínas do hospedeiro é uma importante ferramenta utilizada por diversos microrganismos durante o processo de colonização. Os mecanismos subjacentes ao dano tecidual causado por leptospiros patogênicas ainda são pouco conhecidos. Assim como outras bactérias, leptospiros atravessam barreiras epiteliais e endoteliais para ter acesso aos órgãos. Adesão e degradação de componentes da matriz extracelular, principalmente da membrana basal, são certamente necessárias para invasão. Até então, poucos estudos foram realizados com o objetivo de caracterizar proteases de leptospira. Sabe-se que leptospiros produzem uma gama de gelatinases que variam de 32 a 240 kDa (MADATHIPARAMBIL et al., 2011). Uma delas, conhecida como ColA, é capaz de hidrolisar diferentes tipos de colágeno (KASSEGNE et al., 2014). A deleção do gene que codifica a ColA afeta a transcitose através de monocamadas de células endoteliais e renais e atenua a virulência da estirpe mutante em modelo animal (KASSEGNE et al., 2014). Outra protease estudada é a Leptallo I, uma metaloprotease com atividade proteolítica sobre a elastina, secretada durante o crescimento bacteriano. Anticorpos IgG contra essa proteína são detectados em soros de pacientes com leptospirose (HASHIMOTO et al., 2013).

Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre o papel de proteases secretadas por leptospiros no processo de infecção, nosso grupo avaliou a atividade proteolítica de proteases presentes no

sobrenadante de cultura de duas estirpes de leptospira, uma patogênica (virulenta) e outra saprófita. Como substratos, foram avaliados componentes da matriz extracelular (matrigel, laminina e as proteoglicanas decorina, biglicam e lumicam) e do plasma (fibrinogênio, plasminogênio, trombina e fibronectina plasmática). Os resultados mostraram que proteases presentes apenas no sobrenadante da estirpe virulenta foram capazes de degradar as três proteoglicanas acima mencionadas assim como fibrinogênio e fibronectina plasmática (da SILVA et al., 2018). Com o uso de inibidores das principais classes de proteases, foi possível atribuir a atividade proteolítica observada a metaloproteases, uma vez que as hidrólises só foram abolidas na presença de 1,10 fenantrolina. Uma análise do exoproteoma da estirpe virulenta utilizada foi realizada e permitiu a identificação de seis proteases (Tabela 1). Dentre as metaloproteases identificadas merece especial atenção a “pappalysin-1 domain protein” (EKO25673.1).

**Tabela 1.** Proteases identificadas no exoproteoma de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (LPF)

EMBL GenBank	Proteína	Gene	Classe
EKO25673.1	<i>Pappalysin-1 domain protein</i>	LEP1GSC104_4629	Metalopeptidase
AAN49383.1	<i>Predicted Zn-dependent protease</i>	<i>tldD</i>	Metalopeptidase
AAN49656.2	<i>Methionine aminopeptidase</i>	<i>map</i>	Metaloaminopeptidase
EMP06453.1	<i>Papain Family cysteine protease</i>	LEP1GSC124_0278	Cisteínopeptidase
M3CS93	<i>ATP-dependent protease ATPase subunit HslU</i>	<i>hslU</i>	Peptidase
AAN49152.2	<i>ATP-dependent Clp protease proteolytic</i>	<i>clpP</i>	Serinoendopeptidase

(da SILVA et al., 2018)

#### 1.4. PAPPALYSIN-1 DOMAIN PROTEIN (LEPTOLISINA) DE *LEPTOSPIRA*

O alinhamento de sequências realizado com o programa *Analysis Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) revelou um alto grau de conservação da “pappalysin-1 domain protein” entre as espécies patogênicas de *Leptospira*. Uma proteína ortóloga humana, “pregnancy-associated plasma protein-A” (PAPP-A), foi inicialmente descrita como uma proteína abundante na placenta detectada em mulheres grávidas. Estudos posteriores mostraram que PAPP-A é expressa em uma variedade de tecidos e encontra-se associada a glicosaminoglicanas na superfície das células. Participa de vários processos fisiológicos incluindo a formação de ossos, inflamação, cicatrização e fertilidade feminina. Esta metaloprotease secretada alveja principalmente proteínas que se ligam a fatores de crescimento insulina-like (OXVIG, 2015). A papalisina de *Leptospira* é uma protease da família M43 do tipo B dependente de zinco, que possui aproximadamente 52 kDa e sítio ativo HEXXHXXGXXH.

Análises de bioinformática visando à identificação de novos supostos homólogos de PAPP-A contendo ao menos o domínio catalítico permitiram uma classificação das papalisinas em dois grandes grupos: um inclui sequências de bactérias, arqueas e fungos que possuem apenas o domínio catalítico e um pró-domínio (papalisinas pequenas), enquanto o outro engloba proteínas com múltiplos domínios e é encontrado em mamíferos, peixes, aves e anfíbios (papalisinas longas) (TALLANT et al., 2006; GARCÍA-CASTELLANOS et al., 2007). Até então, raríssimos estudos foram realizados com papalisinas de bactérias. Vale mencionar aqueles conduzidos com a protease ulilisina, da bactéria *Methanosarcinaacetivorans*, que contém o domínio catalítico da papalisina e um pró-domínio envolvido na manutenção do estado inativo do zimogênio pro-ulilisina, e os estudos que caracterizaram a mirolisina, outra LysargiNase de *Tannerella forsythia* (TALLANT et al., 2006, 2007; GARCÍA-CASTELLANOS et al., 2007; HUESGEN et al., 2014; JUSKO et al., 2015; KONERU et al., 2017; GUEVARA et al., 2020; ZAK et al., 2021). Tais estudos mostram que a ulilisina é ativa contra vários substratos incluindo caseína, azoalbumina e componentes da matriz extracelular. Ainda, apresenta atividade gelatinolítica e degrada elastina, actina e fibrinogênio

(TALLANT et al., 2007). A mirolisina também tem como alvo proteínas do hospedeiro, como fibronectina, fibrinogênio, proteínas do complemento e o peptídeo antimicrobiano LL-37 (KONERU et al., 2017).

À luz dessas considerações e assumindo que nenhuma proteína com tais características tenha sido descrita em espiroquetas até o momento, este trabalho teve como objetivo caracterizar a proteína com domínio papalisina de *Leptospira* (doravante denominada leptolisina) identificada anteriormente em nossas análises exoproteômicas (da SILVA et al., 2018).

## 2. OBJETIVO

Este projeto tem por objetivo caracterizar funcionalmente a protease leptolisina, uma proteína da família das papalinas, de *Leptospira interrogans*.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produção e caracterização bioquímica e molecular da leptolisina
- Avaliação da atividade proteolítica da leptolisina sobre moléculas e células do hospedeiro: componentes da matriz extracelular, do plasma, do sistema complemento humano e células epiteliais renais
- Ação da leptolisina na inflamação e coagulação
- Caracterização da cepa nocaute para o gene que codifica a leptolisina



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANÁLISES *IN SILICO*

##### 3.1.1. Modelagem da estrutura tridimensional da proteína leptolisina

A estrutura 3D da leptolisina foi modelada usando o servidor Robetta (new.robetta.org; acessado em 10 de outubro de 2021) (KIM et al., 2004; BAEK et al., 2021), com base na sequência completa de aminoácidos da proteína (Uniprot ID Q72LV9) excluindo seu peptídeo sinal (aminoácidos 1-22). Este servidor é continuamente avaliado pela plataforma CAMEO (Continuous Automated Model Evaluation) que verifica a acurácia e confiabilidade das predições. Cinco modelos foram gerados e analisados pelo MolProbity (molprobity.biochem.duke.edu, acessado em 16 de outubro de 2021), um sistema amplamente utilizado de validação de modelos para estruturas de proteínas (WILLIAMS et al., 2018). O melhor modelo preditivo foi selecionado e utilizado em análises posteriores. A proteína ulilisina de *Methanosarcina acetivorans* (PDB: 3LUM), que abriga um domínio papalisina-1, foi utilizada para modelagem comparativa.

##### 3.1.2. Previsão de sítios de ligação a metais e substratos

A previsão de sítios de ligação a cálcio, zinco e substratos da leptolisina foi avaliada com COACH (<https://zhanggroup.org/COACH/>), uma abordagem de meta-servidor que usa a combinação de cinco métodos (TM-SITE, S-SITE, incluindo COFACTOR, FINDSITE e ConCavity) para gerar previsões finais dos sítios de ligação (YANG et al., 2013). Os resíduos consenso de ligação previstos pelo COACH foram comparados com outras peptidases M43 para avaliar a conservação entre espécies.

### 3.1.3. Comparação da leptolisina com outras metaloproteases contendo domínio papalisina da família M43B

Meg Align 4.0 foi usado para avaliar a conservação de resíduos da leptolisina dentro dos sítios preditos de ligação a metais com aqueles presentes em outras metaloproteases. A sequência da leptolisina (número de acesso Uniprot (UP): Q72LV9) foi alinhada por Muscle (EDGAR, 2004) às sequências de: ulilisina de *Methanosarcina acetivorans* (UP: Q8TL28), mirolisina de *Tannerella forsythia* (UP: A0A0F7IPS1), metaloprotease extracelular MGYG\_00389 de *Arthroderma gypseum* (UP: E5QZI4), ulilisina de *Rhodococcus opacus* (UP: A0A076EJ19), papalisina-1 de *Homo sapiens* (UP: Q13219) e papalisina-2 de *Homo sapiens* (UP: Q9BXP8). PyMol foi usado para alinhar as estruturas de leptolisina, ulilisina de *M. acetivorans* (Pdb: 3LUM e 2CKI) e mirolisina madura de *Tannerella forsythia* (6R7W).

### 3.1.4. Avaliação da conservação da proteína leptolisina nas espécies do gênero *Leptospira*

A conservação do domínio catalítico da leptolisina entre as espécies de *Leptospira* foi avaliada usando o programa Muscle. Um fragmento abrangendo o domínio do sítio ativo dependente de zinco HEXXHXXGXXH (aminoácidos 386 – 480) da leptolisina de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi alinhado e comparado com a leptolisina de dezesseis espécies patogênicas de *Leptospira* do subclado P1, seis espécies do subclado P2, três espécies saprofíticas do subclado S1 e uma do subclado S2 (Tabela 2).

As sequências das leptolisinas secretadas por diferentes espécies do gênero *Leptospira* também foram alinhadas (ClustalW) utilizando o programa DNA-Star Lasergene, e comparadas quanto à similaridade com a proteína de *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, sorovar Copenhageni (WP\_000914951.1). Uma árvore filogenética baseada nas sequências de aminoácidos das proteínas comparadas foi construída utilizando o algoritmo BIONJ.

**Tabela 2.** Espécies de *Leptospira* incluídas no alinhamento do domínio catalítico da leptolisina

<b>Espécie</b>	<b>Nº acesso</b>	<b>Subclado</b>
<i>L. interrogans</i>	UP:Q72LV9	P1
<i>L. kirschneri</i>	NCBI: WP_016753460.1	P1
<i>L. noguchii</i>	NCBI: WP_020980541.1	P1
<i>L. santarosai</i>	NCBI: WP_075979720.1	P1
<i>L. mayottensis</i>	NCBI: WP_117339425.1	P1
<i>L. borgpetersenii</i>	NCBI: WP_061220861.1	P1
<i>L. alexanderi</i>	NCBI: WP_078128193.1	P1
<i>L. weilii</i>	NCBI: WP_004508724.1	P1
<i>L. alstonii</i>	NCBI: WP_020771835.1	P1
<i>L. yasudae</i>	NCBI: WP_118954567.1	P1
<i>L. barantonii</i>	NCBI: WP_135669758.1	P1
<i>L. kmetyi</i>	NCBI: WP_100737846.1	P1
<i>L. tipperaryensis</i>	NCBI: WP_069608932.1	P1
<i>L. stimsonii</i>	NCBI: WP_118980449.1	P1
<i>L. adleri</i>	NCBI: WP_100784592.1	P1
<i>L. ellisii</i>	NCBI: WP_100745687.1	P1
<i>L. gomenensis</i>	NCBI: WP_135590981.1	P1
<i>L. fainei</i>	NCBI: WP_016549876.1	P2
<i>L. fluminis</i>	NCBI: WP_135812479.1	P2
<i>L. fletcheri</i>	NCBI: WP_135767071.1	P2
<i>L. perolatii</i>	NCBI: WP_100713649.1	P2
<i>L. broomii</i>	NCBI: WP_020987394.1	P2
<i>L. inadai</i>	NCBI: WP_068872775.1	P2
<i>L. biflexa</i>	UP: B0SJW7	S1
<i>L. bourretii</i>	NCBI: WP_135748451.1	S1
<i>L. jelokensis</i>	NCBI: WP_135751084.1	S1
<i>L. ryugenii</i>	UP: A0A2P2DVA2	S2

### 3.1.5. Predição da estabilidade do sítio catalítico da leptolisina em leptospiros do subclado P1, P2 e S

O alinhamento de sequências de leptolisinas de múltiplas espécies de *Leptospira* revelou resíduos não conservados próximos aos sítios de ligação a zinco, cálcio e arginina. O servidor Duet (<http://biosig.unimelb.edu.au/duet/stability>) foi usado para prever os efeitos das variações de aminoácidos - encontradas em leptospiros dos subclados P1, P2 e S - na estabilidade da leptolisina.

## 3.2. PRODUÇÃO DA LEPTOLISINA RECOMBINANTE E DETECÇÃO DA PROTEÍNA NATIVA

### 3.2.1. Sorovares

As bactérias utilizadas neste projeto foram fornecidas pelo Prof. Marcos Bryan Heineman do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ou pelo Dr. Elsie Wunder da Universidade de Yale (Tabela 3). A virulência das cepas Fromm, L1-130 e L495 foi mantida por infecções sucessivas em hamsters. As bactérias foram isoladas do fígado e utilizadas por até seis passagens em cultura *in vitro*.

**Tabela 3.** Sorovares de *Leptospira* usados neste estudo

Sorovares	Procedência
<i>L. interrogans</i> sorovar Kennewicki Fromm	FMVZ - USP
<i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni 10A	FMVZ - USP
<i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni L1-130	FMVZ - USP
<i>L. kirshneri</i> sorovar Cynopteri 3522 C	FMVZ - USP
<i>L. biflexa</i> sorovar Andamana CH11	FMVZ - USP
<i>L. biflexa</i> sorovar Patoc Patoc I	FMVZ - USP
<i>L. interrogans</i> sorovar Manilae L495	Universidade de Yale
<i>L. interrogans</i> sorovar Manilae L495 $\Delta$ <i>lic13434</i>	Universidade de Yale

### 3.2.2. Clonagem do gene que codifica a leptolisina de *Leptospira interrogans*

O gene que codifica a leptolisina (*lic13434*) de *L. interrogans* foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 10A com os oligonucleotídeos sintéticos iniciadores (F) 5' GGATCCAAAGGCAAAGACGATAATTCTAAAAAC 3' e (R) 5' CCATGGTTAATATACAAGAGGGTGAGAACGG 3' contendo sítios de restrição apropriados (*Bam*HI e *Nco*I, respectivamente). A banda correspondente ao produto amplificado foi purificada do gel de agarose 1% utilizando-se o kit PureLink (Quick Gel Extraction Kit) da Invitrogen. O inserto foi então clonado no vetor pGEMT-easy. Este vetor permite a clonagem de produtos de PCR através da ligação A – T. Possui origem de replicação do fago f1, o gene que confere resistência à ampicilina (*Amp*<sup>r</sup>), o códon de iniciação do *lacZ* e a sequência do operon *lac*. Contém sítios múltiplos de clonagem (SMC) localizados no meio do gene que codifica a  $\beta$ -galactosidase (o gene *lacZ*). Dessa forma, quando se consegue clonar com sucesso o inserto, a transcrição do gene é interrompida. A suplementação do meio LB-agar com 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (X-Gal) e isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) leva ao surgimento de colônias de cor branca. Caso a clonagem não tenha sucesso e, deste modo, a inserção não ocorra, as colônias passam a apresentar uma cor azul. A diferença de cor ocorre devido à degradação do X-Gal pela atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase, que é induzida pela presença de IPTG no meio e que produz esse precipitado de cor azul.

A reação de ligação do fragmento gênico ao vetor de clonagem pGEM-T easy foi feita em volume de 10  $\mu$ L, mantida 1 h a temperatura ambiente, e a 16°C por 16-20 h. Bactérias DH5 $\alpha$  competentes (50  $\mu$ L) foram transformadas com 10  $\mu$ L do produto de ligação por choque térmico de 2 min a 42°C. Adicionou-se 1 mL de meio SOC (2 % bactotripton, 0,5 % de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> e 20 mM de glicose) às bactérias e incubou-se durante 1 h a 37°C. As bactérias foram então plaqueadas em meio LB/Amp/Agar (meio LB com ampicilina 100  $\mu$ g/mL) contendo IPTG (0,1 M) e X-gal (50 mg/mL) e incubadas por 16-20 h a 37°C.

Colônias brancas isoladas de *E. coli* DH5 $\alpha$  foram inoculadas em 2,5 mL de meio líquido LB-amp e incubadas por 16 h a 37°C sob agitação de 130 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). As construções foram analisadas por sequenciamento. Um clone contendo a sequência correta foi selecionado para posterior subclonagem no vetor de expressão pAE.

O vetor pAE foi construído a partir dos plasmídeos pRSET e pET3-His (RAMOS et al., 2004). Possui promotor do fago T7 (controla a clonagem do gene de interesse), sítio de ligação ao ribossomo (RBS), sítios para múltiplas clonagens (SMC), terminador de transcrição (term) e sequência codificadora para  $\beta$ -lactamase que confere resistência à ampicilina (AMP). Possui uma região codificadora para 6 resíduos de histidina (His) na extremidade amino-terminal da proteína recombinante. As construções plasmidiais em vetor pGEM-T easy e o vetor pAE foram digeridos com as enzimas de restrição *NcoI* e *BamHI*. A digestão foi feita a 37°C por 1,5 h em um volume total de 10  $\mu$ L. Os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o kit PureLink (Quick Gel Extraction Kit). Para a ligação foram utilizados 1  $\mu$ L de enzima DNA ligase (1,8 U), 2  $\mu$ L de tampão *Rapid ligation 5X*, 6  $\mu$ L de inserto purificado (100 ng) e 1  $\mu$ L do vetor pAE (~50 ng) em um volume final de 10  $\mu$ L. Essa reação foi incubada por 1 h a temperatura ambiente e a 16°C por 16-20 h. Foram utilizados 5  $\mu$ L do produto de ligação na transformação de bactérias competentes DH5 $\alpha$  por choque térmico de 2 min a 42°C. Adicionou-se 1 mL de meio SOC às bactérias e incubou-se durante 1 h a 37°C. As bactérias foram então plaqueadas em meio LB/Amp/Agar (Meio LB com ampicilina 100  $\mu$ g/mL) e incubadas por 16-20 h a 37°C. Colônias foram selecionadas conforme já descrito para a extração dos plasmídeos utilizando-se o kit de mini-preparação comercial da Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit). Duplas digestões com *NcoI* e *BamHI* foram realizadas para confirmação da presença do inserto.

### 3.2.3. Sequenciamento

A análise da sequência de DNA dos plasmídeos recombinantes foi feita pelo método de Sanger (SAMBROOK et al., 1989), adaptado para sequenciador automático capilar ABI3100 (Applied Biosystems) (Perkin Elmer). O sequenciamento foi feito utilizando-se 150 ng das mini-preparações de DNA plasmidial e 1,6 pmol de primers em água Milli-Q autoclavada. Empregou-se o kit Bigdye® Terminator v3.1, cycle sequencing kit Perkin Elmer, seguindo protocolo do fabricante. Os primers M13F (5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3') e M13R (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') foram utilizados no sequenciamento dos fragmentos clonados no vetor pGEM-T easy. As sequências obtidas foram analisadas e alinhadas com o auxílio do software BioEdit e foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados do NCBI através do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 3.2.4. Expressão e purificação da leptolisina de *L. interrogans*

*Escherichia coli*, cepa BL21(DE3), foi transformada com o plasmídeo pAE-*lic13434*. Um colônia isolada foi inoculada em 1 L do meio rico 2x-HKSII (JENSEN e CARLSEN, 1990) contendo ampicilina (100 mg/mL) e incubou-se a 37°C sob agitação (200 rpm). Quando a DO<sub>600</sub> nm atingiu 3,0, 0,5 mM de IPTG foi adicionado à cultura, que foi mantida sob agitação a 150 rpm por mais 16 h a 30°C. A cultura foi centrifugada a 12.000 x g por 15 min a 4°C, e o sedimento foi ressuspenso em tampão de lise (Tris HCl 0,1 M, pH 8, EDTA 5 mM, contendo 50 µg/mL de lisozima e 0,1% deoxicolato de sódio) e submetido à sonicação. Os corpúsculos de inclusão foram lavados duas vezes em tampão de lavagem (Tris HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 5 mM e 0,1% deoxicolato de sódio), centrifugados e ressuspenso em um tampão contendo TrisHCl 0,05 M pH 8 e EDTA 1 mM, depois foram centrifugados novamente e ressuspenso no mesmo tampão (CHURA-CHAMBI et al., 2013). Alíquotas da suspensão foram mantidas a -20°C. A solubilização dos corpúsculos de inclusão utilizando alta pressão hidrostática foi alcançada diluindo-se 1 mg dos corpúsculos em um tampão contendo CAPS 50 mM pH 11, EDTA 1 mM e arginina 0,4 M. A suspensão foi acondicionada em

sacos plásticos que foram lacrados, colocados dentro de outro saco plástico selado a vácuo e colocado em um vaso de pressão (R4-6-40, *High Pressure Equipment*, EUA). Aplicou-se 2,4 kbar de pressão por 1,5 h usando óleo como fluido de transmissão em uma bomba adequada de alta pressão (PS-50, *High Pressure Equipment*, EUA) a 20°C. Após a descompressão, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 15 min e dialisada contra tampão fosfato de sódio 25 mM pH 8 e 4°C. A leptolisina solúvel foi novamente centrifugada e purificada por cromatografia de exclusão de tamanho. A proteína foi aplicada na coluna Superdex 200 10/300 (GE Healthcare LifeSciences) acoplada a um sistema ÄKTA Purifier (GE Healthcare). Fosfato de sódio 25 mM pH 8 foi usado para eluição a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. A concentração da proteína foi estimada pelo ensaio do ácido bicinonínico (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). A protease purificada foi alíquotada e mantida a -80°C até a realização dos ensaios funcionais e a proteína recombinante foi analisada em gel de poli(acrilamida) conforme descrito abaixo. O procedimento foi realizado em colaboração com o grupo das Dras. Rosa Chura-Chambi (IPEN/Instituto Butantan) e Lígia Morganti do IPEN.

### **3.2.5. SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)**

As eletroforeses foram realizadas em condições desnaturantes utilizando-se tampão de amostra redutor 5x (Tris HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 100 mM), aplicando-se uma amperagem de 25 mA a temperatura ambiente, em tampão de corrida (Tris HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3). Para o preparo dos géis foi utilizado um mix de acrilamida sendo 12% para o gel de separação e 5% para o de empilhamento. A espessura dos géis foi de 1 mm. As amostras foram desnaturadas por 3-5 min a uma temperatura de 96°C, e então aplicadas no gel. Utilizou-se o marcador de peso molecular *Kaleidoscope* e a coloração dos géis foi feita com solução corante (ácido acético glacial 10%, etanol 45% e azul Coomassie R250 0,25%). Os géis foram descorados com solução descorante (ácido acético glacial 10% e etanol 30%) até que as bandas de proteína ficassem nítidas.



### 3.2.6. Produção de soro policlonal contra a leptolisina em coelho

O protocolo para obtenção de antissoro foi submetido à aprovação pelos Comitês de Ética no Uso de Animais do ICB-USP (CEUA N° 6048190318) e do Instituto Butantan (CEUA N° 4505190318). Um coelho macho (linhagem Nova Zelândia com aproximadamente 60 dias de idade) foi imunizado pela via intramuscular com 75 µg de proteína recombinante e 2,5 mg de hidróxido de alumínio como adjuvante. As imunizações foram feitas em 4 doses com intervalos de 15 dias. O animal foi sangrado via plexo auricular antes das imunizações para controle do soro (sangria pré-imune) e após as imunizações (sangria de prova e sangria final). Quinze dias após a 4ª dose foi feita a sangria total por punção cardíaca. Em todas as etapas os volumes de sangue coletados foram centrifugados por 5 min a 3.000 x g e o soro separado. Os títulos de anticorpos foram determinados por ELISA. A proteína recombinante leptolisina (1 µg/poço) foi imobilizada em placa de 96 poços (Costar) por 16 h a 4°C com *coating buffer* (tampão carbonato, bicarbonato 0,1 M, pH 9,6). A placa foi lavada 3 vezes com PBS - Tween 0,05% (PBS-T), e os soros dos animais foram aplicados em diluições seriadas (1:50 até 1:104.000). A placa foi incubada por 1 h a 37°C e novamente lavada 3 vezes. Realizou-se incubação por 1 h a 37°C com anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase na diluição de 1:5.000 em PBS - Tween 0,01%, leite em pó desnatado 1%. A placa foi lavada novamente 3 vezes e a revelação feita com o- phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 0,05% e 0,015% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluídos em tampão citrato-fosfato pH 5 por aproximadamente 5 min, e foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. A leitura da absorbância foi feita a 492 nm (Leitora Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific). O título de anticorpos foi considerado como a diluição do soro capaz de resultar em leitura de absorbância igual a 0,1 a 492 nm (AUSUBEL et al., 1990).

### 3.2.7. Detecção da leptolisina no sobrenadante de cultura de *Leptospira* por Western blot

Para obtenção dos sobrenadantes de cultura, as bactérias *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130, *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 10A, *L. kirshneri* sorovar Cynopteri estirpe 3522 C, *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11 e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I foram cultivadas em meio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH, Difco) suplementado com enriquecimento (*Leptospira Enrichment EMJH*, Difco) a temperaturas de 28 - 30° C. Após centrifugação, foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,4, contadas em microscópio de campo escuro utilizando-se uma câmara de Petroff-Hausser e ressuspensas em PBS de forma a se obter  $1 \times 10^9$  bactérias. As suspensões bacterianas foram incubadas a 37°C por 4 h para que ocorresse a secreção de proteases. Os sobrenadantes foram coletados após centrifugação, filtrados (filtros de 0,22 µm) e a concentração total de proteínas foi determinada pelo *Kit BCA Protein Assay* (Pierce). Essas condições foram as mesmas adotadas para a realização das análises do exoproteoma mencionado na Introdução (da SILVA et al., 2018). Proteínas do sobrenadante (5 µg) foram solubilizadas em tampão redutor, aquecidas por 3 min a 96° C, submetidas a eletroforese (SDS-PAGE-12%) e transferidas para membrana de nitrocelulose. O bloqueio foi feito com 10% de leite em pó desnatado diluído em PBS-T por um período de 16 h a 4°C. Os anticorpos primários (soro anti-leptolisina na diluição 1:500) e secundários (anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase na diluição 1:5.000) diluídos em PBS-T com 5 % de leite em pó desnatado foram incubados, em sequência, por 1 h à temperatura ambiente com agitação. A membrana foi lavada três vezes com PBS-T por 5 min entre cada uma das etapas anteriores e a revelação foi feita com SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate seguindo as instruções do fabricante.

### 3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA LEPTOLISINA

#### 3.3.1. Ação da leptolisina recombinante sobre substratos FRET (*Free Resonance Energy Transfer*)

Os substratos *FRET* Abz-GLARSNL-EDDnp (fragmento de C3) e Abz-GLQRALEI-EDDnp (fragmento de C4) foram adquiridos da GenOne Biotechnologies. Os substratos Abz-GGLFLRR-EDDnp, Abz- Abz-FLRRV-EDDnp e Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp foram gentilmente fornecidos pelo Prof. Luiz Juliano Neto, do Departamento de Biofísica da UNIFESP-EPM, São Paulo. Os experimentos foram realizados em colaboração com o grupo da Dra. Fernanda Portaro, do Instituto Butantan.

A ação da leptolisina em diferentes pHs, temperaturas e tampões, assim como a inibição de sua atividade com diferentes classes de inibidores de proteases foi avaliada com o substrato FRET Abz-GLARSNL-EDDnp (5  $\mu$ M). Todos os ensaios foram realizados com 0,5  $\mu$ g da protease no volume final de 100  $\mu$ L, e monitorados em fluorímetro Hidex Sense ajustado para leituras de excitação e emissão em 320 e 420 nm, respectivamente. A temperatura permaneceu constante em 37°C (exceto no ensaio de temperatura) e as leituras foram realizadas em 15 ou 30 min. Para determinar a influência do pH na atividade da leptolisina, foram preparados tampões segundo STOLL e BLANCHARD (1990), cada um na concentração final de 50 mM: fosfato de sódio (pH 5,0 - 7,5), tampão borato (pH 8,0 - 9,0) e borato -NaOH (pH 9,5 - 10,0). A atividade da leptolisina em tampão borato 50 mM pH 8,0 foi analisada na presença de cátions mono e divalentes como seus cloretos (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>) na concentração final de 50 mM. O efeito da temperatura na atividade da protease foi avaliado entre 25 e 42°C, com adição de substrato após 15 min de incubação em cada temperatura em tampão borato 50 mM, NaCl 50 mM pH 8,0. O efeito de inibidores específicos foi avaliado usando EDTA 50 mM, 1-10-fenantrolina 2 mM, PMSF 2 mM ou E-64 10  $\mu$ M incubados com leptolisina 30 min antes da adição do substrato. O mesmo volume de álcool (veículo usado para diluir alguns inibidores) foi utilizado como controle. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP em

triplicata. Os resultados relativos à influência de sais e inibidores da atividade proteolítica da leptolisina foram analisados pelo teste *one-way* ANOVA para comparações entre grupos, e por um teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software).

### **3.3.2. Determinação dos pontos de hidrólise e da atividade específica da leptolisina sobre substratos FRET**

Os pontos de clivagem produzidos pela leptolisina de *L. interrogans* nos substratos fluorescentes foram determinados por análise de espectrometria de massas. A hidrólise dos substratos (5  $\mu\text{M}$ ) em borato 50 mM, NaCl 50 mM pH 8,0 (volume final 100  $\mu\text{L}$ ) e 0,5  $\mu\text{g}$  de leptolisina foi monitorado no fluorímetro Hydex Sense 425-301, conforme descrito acima, e os pontos de clivagem foram determinados em um espectrômetro de massas MALDI-TOF. As ligações cindíveis foram deduzidas a partir das sequências dos fragmentos dos substratos, e essas análises foram realizadas no equipamento Aimal Performance no modo linear positivo. Um microlitro de cada amostra foi co-cristalizado com ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (solução saturada acetonitrila/água/0,1% ácido trifluoroacético), e seco à temperatura ambiente. As amostras foram analisadas e os espectros foram obtidos usando o modo linear positivo. As atividades específicas foram determinadas pela incubação de leptolisina (0,23 - 1,16  $\mu\text{g}$ ) com os substratos FRET(5  $\mu\text{M}$ ), como descrito acima. Os resultados foram obtidos usando o GraphPad software Prism 5 e expressos em  $\mu\text{M}$  de substrato consumido por  $\mu\text{g}$  de leptolisina por minuto ( $\mu\text{M}/\mu\text{g}/\text{min}$ ).

### 3.3.3. Atividade proteolítica da leptolisina de *L. interrogans* sobre componentes da matriz extracelular e do plasma

A leptolisina recombinante (25, 50, 100 ou 200 ng) foi inicialmente incubada com as proteoglicanas mimecam, lumicam, biglicam e decorina (0,5 µg), e com fibronectina plasmática (5 µg) a 37 °C por 24 h em tampão Tris HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM e 0,05% de CHAPS, pH 7,4. Uma vez definida a quantidade ideal da protease necessária para hidrolisar a maioria dos substratos (100 ng), as incubações foram realizadas nos tempos 0, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24 h nas mesmas condições acima descritas. Os produtos das degradações foram analisados por Western blot. Os produtos de incubação foram solubilizados em tampão redutor, aquecidos por 3 min a 96° C, submetidos a eletroforese (SDS-PAGE-12%) e transferidos para membranas de nitrocelulose. O bloqueio foi feito com 10% de leite em pó desnatado diluído em PBS-T por um período de 16 h a 4° C. Os anticorpos primários e secundários diluídos em PBS-T com 5 % de leite em pó desnatado foram incubados, em sequência, por 1 h à temperatura ambiente com agitação. As diluições para cada um dos anticorpos primários utilizados (R & D Systems) foram: anti-mimecam (1:3.750), anti-lumicam (1:7.500), anti-biglicam (1:3.750) e anti-decorina (1:3.750). As diluições para cada um dos anticorpos secundários utilizados foram: anti-cabra conjugado à peroxidase (1:10.000) e anti-coelho conjugado à peroxidase (1:5.000). As membranas foram lavadas três vezes com PBS-T por 5 min entre cada uma das etapas anteriores e a revelação foi feita com SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate seguindo as instruções do fabricante. No caso da fibronectina plasmática, alternativamente à realização de Western blot, foi feita coloração dos géis por prata (solução fixadora: 50% etanol, 12% ácido acético e 0,05% formaldeído 37%, solução álcool:etanol 30%, solução de tiosulfato de sódio:0,02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, solução corante: 0,1% AgNO<sub>3</sub> e 0,075% formaldeído 37%, solução reveladora: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 0,05% formaldeído 37%, e solução de interrupção: 50% etanol e 12% ácido acético). Cada solução descrita acima foi acrescentada em volume suficiente para cobrir os géis e foram descartadas após o término do tempo estipulado de

agitação. Primeira etapa: a solução fixadora foi acrescentada, aqueceu-se por 30 seg em forno de microondas e os géis imersos em solução foram mantidos em agitação por 5 min. Segunda etapa: a solução álcool foi acrescentada sobre os géis, aquecida por 30 seg e mantida em agitação por 5 min. Terceira etapa: a solução de tiosulfato de sódio foi acrescentada, aquecida por 30 seg e mantida em agitação por 2 min. Quarta etapa: foram realizadas duas lavagens em água destilada. Em cada lavagem os géis cobertos de água foram aquecidos por 30 seg e mantidos em agitação por 2 min. Quinta etapa: a solução corante foi acrescentada e os géis aquecidos por 30 seg e a agitação foi mantida por 5 min. Em seguida, os géis passaram por outra lavagem em água destilada e manteve-se em agitação por 1 min. Após esta etapa, foi adicionada a solução reveladora, a agitação foi mantida até o aparecimento das bandas nos géis. Com o surgimento das bandas de interesse, a coloração foi interrompida pelo acréscimo da solução de ácido acético 5%, mantida em agitação por 30 seg.

Com o objetivo de inibir a atividade proteolítica, a proteína recombinante (100 ng) foi previamente incubada com 1,10 fenantrolina (5 mmol/L), por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os substratos e as reações foram incubadas conforme acima mencionado. A inibição das degradações também foi analisada segundo acima descrito.

#### **3.3.4. Atividade proteolítica da leptolisina de *L. interrogans* sobre células renais HK-2**

As células renais humanas HK-2 (epiteliais de túbulos proximais dos rins), foram gentilmente cedidas pelo Prof. Niels Olson Saraiva Câmara, do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As células foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12 suplementado com 5% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 20 mM de tampão HEPES, 0,4 µg/mL de hidrocortisona, 5 µg/mL de insulina, 5 µg/mL de transferrina e 5 µg/mL de selenito de sódio em garrafas T75 até o momento da utilização (TIAN et al., 2006). Para realização dos ensaios, as células foram soltas dos poços utilizando TrypLE express (Gibco, EUA), conforme indicado pelo fabricante, e contadas em câmara de Neubauer. Foram então

semeadas em placas de 96 poços na concentração de  $2,5 \times 10^5$ / poço e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem 60-70% de confluência (LENTZ et al., 2011; YUN et al., 2018). Foi então acrescentado meio de cultivo celular sem soro fetal bovino 24 h antes da realização dos experimentos para sincronização do ciclo celular. As células foram incubadas com 0,1 µg, 0,5 µg ou 1 µg de leptolisina, ou com 5 µg de sobrenadante de cultura de *L. interrogans* Manilae L495 por 24 h. As células também foram tratadas com leptolisina (0,5 µg) ou sobrenadante de Manilae L495 pré-incubados por 30 min a 37 °C com soro anti-leptolisina (1: 100). Controles negativos incluíram células com meio de cultura sem soro fetal bovino e células incubadas com tampão (Tris HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM e 0,05% de CHAPS, pH 7,4). Ao término das incubações as células foram analisadas em microscópio óptico e fotografadas.

A atividade proteolítica da leptolisina sobre a fibronectina secretada pelas células HK-2 também foi avaliada, tanto por Western blot, conforme descrito a seguir, quanto por imunofluorescência, conforme descrito no parágrafo que se segue. As células, cultivadas como descrito acima, foram incubadas com 0,1 µg de leptolisina recombinante diluída no tampão acima mencionado por 2, 4 e 8 h. A protease foi adicionada diretamente aos poços contendo as células em cultura. Após as incubações, alíquotas do sobrenadante das células (20 µL) foram solubilizadas em tampão redutor, submetidas a eletroforese (SDS-PAGE-12%) e as proteínas transferidas para membranas de nitrocelulose. O bloqueio foi feito com 10% de leite em pó desnatado diluído em PBS-T por um período de 16 h a 4°C. O anticorpo primário (anti-fibronectina 1:7.500, Sigma) e secundário (anti-IgG de coelho 1:5.000, Sigma) diluídos em PBS-T com 5 % de leite em pó desnatado foram incubados, em sequência, por 1 h à temperatura ambiente com agitação. A membrana foi lavada três vezes com PBS-T por 5 min e a revelação foi feita com SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate seguindo as instruções do fabricante.

Ensaio de imunofluorescência foram utilizados para comprovar a atividade proteolítica da leptolisina sobre a fibronectina secretada pelas células HK-2 e também para avaliar o efeito da

protease sobre algumas moléculas que compõem as *tight junctions* das células HK-2: zonula occludens-1 e ocludina. As células HK-2 foram semeadas em placas de 6 poços contendo lamínulas de vidro de 18 mm (Knittel) na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL e incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 72 h. O meio de cultura foi então substituído por meio sem soro fetal bovino e após 24 h as células foram tratadas com 1 µg de leptolisina recombinante por 24 h. Após incubação o sobrenadante de cultura foi removido e as células foram fixadas com 2% de formalina durante 15 min e lavadas com PBS três vezes. Foram então permeabilizadas com Triton X-100 0,1% diluído em PBS por 4 min. Após permeabilização, as células foram lavadas novamente conforme descrito e realizou-se bloqueio com PBS-BSA 2 % durante 30 min. Foram em seguida incubadas por 45 min com os anticorpos primários diluídos em PBS-BSA 2 %. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-fibronectina plasmática (1:7.500, Sigma), anti-zonula occludens (1:500, Thermo Fisher Scientific), e anti-occludina (1:500, Thermo Fisher Scientific). Após três lavagens as células foram incubadas com anticorpos secundários anti-coelho conjugado com FITC (Sigma) ou anti-camundongo conjugado com FITC (Thermo Fisher Scientific) diluídos em PBS-BSA 2 % contendo iodeto de propídio na diluição de 1:1.000, durante 1 h. As células foram lavadas com PBS três vezes. Uma gota de solução de montagem Citifluor (Electron Microscopy Sciences) foi colocada em uma lâmina de microscopia e as lamínulas foram colocadas com a face contendo as células em contato com a solução de montagem e seladas com esmalte para unhas. As análises e o registro das imagens foram feitos em um microscópio confocal a laser (TCS SP8, Leica). O programa da Leica LAS X foi usado para aquisição de imagens, e as lentes objetivas usadas foram HC PL APO CS 63 × 1.20 W.

### **3.3.5. Atividade proteolítica da leptolisina de *L. interrogans* vivo**

A ação da leptolisina foi avaliada *in vivo* inoculando-se a protease na região dorsal de camundongos (procedimento aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação, CEUAIB N° 1033050321). Camundongos Swiss machos pesando 25 - 30 g foram inoculados por via



intradérmica com 2, 4 ou 6 µg de leptolisina (n = 2 / grupo) e acompanhados durante 4 h. Os grupos controle (n = 2 / grupo) foram inoculados com tampão (Tris HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM e 0,05% de CHAPS, pH7,4) ou com leptolisina (4 µg) pré-incubada durante 30 min com 5 mmol/L de 1,10 fenantrolina. Após 4 h os animais foram eutanasiados, a pele dorsal foi removida e homogeneizada com o aparelho Omnimixer G20(Omni TH®, Omni International) usando tampão de lise (HEPES 50 mM, NaCl200 mM, CHAPS2%, pH 7,5) contendo Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) com 3 ciclos de 30 seg a 4.000 rpm, no gelo. As amostras foram centrifugadas a 14.000 × g, por 10 min a 4°C para remover debris, e o sobrenadante foi guardado para análise (ASEGA et al., 2020). As proteínas da pele dos camundongos controle e dos tratados com leptolisina (4 µg) foram submetidas a SDS-PAGE-10% (para detecção de fibronectina) ou SDS-PAGE-12% (para detecção de β-actina) seguidos por uma análise de Western blot conforme previamente descrito, usando anti-fibronectina produzido em coelho (1: 5.000, Sigma) e anti-β-actina produzido em camundongo (1: 100.000, Sigma), e anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:5.000, Sigma) ou anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1: 10.000, Sigma). A revelação foi feita com SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate seguindo as instruções do fabricante.

### **3.3.6. Atividade proteolítica da leptolisina de *L. interrogans* sobre componentes do sistema complemento humano**

Os ensaios visando avaliar a ação da leptolisina recombinante sobre moléculas do sistema complemento humano foram realizados basicamente conforme descrito no item 3.3.3. A protease (25, 50, 100 ou 200 ng) foi inicialmente incubada com as proteínas purificadas C2 (1 µg), C3 (1 µg), C3b (1 µg), C4 (0,5 µg), C4b (0,5 µg), C5 (1 µg), C6 (1 µg), C7 (0,5 µg), C8 (1 µg) e C9 (0,5 µg), todas adquiridas da Complement Technology, a 37°C por 24 h em tampão Tris HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM e 0,05% de CHAPS, pH 7,4. Uma vez definida a quantidade ideal da protease necessária para hidrolisar a maioria dos substratos (100 ng), as incubações foram realizadas nos

tempos 0, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24 h nas mesmas condições já descritas, assim como os ensaios de inibição realizados com 1,10 fenantrolina. A ação da papalisina recombinante sobre C3, C4 e C5 presentes no soro humano (SHN) também foi avaliada. A protease (0,1, 0,5, 0,75 ou 1 µg) foi incubada com 5 µL de SHN diluído 10 x (C3), com 1 µL de SHN (C4) e 6,7 µL de SHN (C5) a 37°C por 24 h. Essas quantidades baseiam-se nas concentrações séricas de cada componente do complemento.

A atividade proteolítica presente no sobrenadante de cultura de leptospiras selvagens (*L. interrogans* Manilae L495) e de leptospiras mutantes, deficientes de leptolisina (*L. interrogans* Manilae L495 $\Delta$ *lic13434*) foi analisada da mesma forma. Neste caso, foram utilizados 5 µg de sobrenadante e 1 µg de cada molécula do complemento. As incubações duraram 24 h.

Os produtos das degradações foram analisados por Western blot conforme descrito no item 3.2.5. As diluições para cada um dos anticorpos primários utilizados foram: anti-C2 (1:5.000), anti-C3 (1:5.000), anti-C4 (1:2.500), anti-C5 (1:2.000), anti-C6 (1:2.500), anti-C7 (1:5.000), anti-C8 (1:5.000) e anti-C9 (1:2.500). Como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase na diluição 1:10.000.

### **3.3.7. Sobrevivência de *Leptospira biflexa* em SHN tratado com leptolisina**

Para este ensaio, utilizamos um pool de soros humanos (Complement Technology), estocado a -80°C, como fonte de complemento. Para obtenção de soro inativado (SHN-I), alíquotas deste pool de soro foram aquecidas a 56°C durante 30 min após o descongelamento. SHN e SHN-I (40%) foram incubados com leptolisina (1, 3 e 5 µg) a 37°C por 2 h. Após esta incubação, adicionou-se *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I ( $5 \times 10^7$  leptospiras/mL), e incubou-se por mais 2 h a 37°C. As culturas foram avaliadas em microscopia de campo escuro, e o número de bactérias sobreviventes foi contado utilizando-se uma câmara de Petroff-Hausser. Foram realizados 3 ensaios independentes e os resultados com os soros tratados com leptolisina foram comparados àqueles obtidos com soro não tratado (SHN) utilizando-se *Student t test* pareado.

### **3.3.8. Sobrevivência de *L. interrogans* Manilae L495 (selvagem e $\Delta lic13434$ ) em SHN**

*L. interrogans* Manilae L495 e *L. interrogans* Manilae L495  $\Delta lic13434$  ( $5 \times 10^7$  leptospiras/mL) foram incubadas em SHN ou SHN-I (40%) a 37°C por 2 h e contadas em microscópio de campo escuro, utilizando câmara de Petroff-Hausser. A cepa saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, que é suscetível à ação bactericida do soro, foi incluída nas análises como um controle. Foram realizados 3 ensaios independentes e os resultados foram comparados àqueles obtidos com a estirpe não patogênica (Patoc I) utilizando-se *Student t test* pareado.

### **3.3.9. Atividade proteolítica da leptolisina de *L. interrogans* sobre componentes da cascata de coagulação**

A ação da leptolisina recombinante sobre fibrinogênio e trombina foi avaliada basicamente conforme descrito no item 3.3.3. A protease (25, 50, 100 ou 200 ng) foi inicialmente incubada com as proteínas purificadas fibrinogênio (10  $\mu$ g) e trombina (1  $\mu$ g), ambas adquiridas da Sigma, a 37°C por 24 h em tampão Tris HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM e 0,05% de CHAPS, pH 7,4. Uma vez definida a quantidade ideal da protease necessária para hidrolisar os substratos (100 ng), as incubações foram realizadas nos tempos 0, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24 h nas mesmas condições já descritas, assim como os ensaios de inibição realizados com 1,10 fenantrolina. Os produtos das degradações foram analisados por coloração dos géis com prata, conforme descrito no item 3.2.5.

## **3.4. AÇÃO DA LEPTOLISINA NA COAGULAÇÃO E NA INFLAMAÇÃO**

### **3.4.1. Ação da leptolisina de *L. interrogans* no tempo de coagulação utilizando o método de tromboelastometria rotacional**

Plasma humano doado pela pesquisadora Elizabeth Martins, Instituto Butantan (origem: COLSAN – Associação Beneficente de Coleta de Sangue) (260  $\mu$ L) foi incubado por 1 min a 37°C com 0,15  $\mu$ g, 0,3  $\mu$ g, 0,6  $\mu$ g e 1,2  $\mu$ g de leptolisina recombinante diluída em tampão Tris HCl 50 mM,

NaCl 200 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM e 0,05% de CHAPS, pH 7,4, ou na presença do ativador de coagulação TTPa (BIOS Diagnóstica). Após incubação foi feita a recalcificação com 20 µL de CaCl<sub>2</sub> 0,2 M. O parâmetro de tempo de coagulação (CT) foi registrado em um sistema computadorizado ROTEM® de quatro canais (Pentapharm), de acordo com as instruções do fabricante para o método ROTEM (INTEM) durante 1 h.

### **3.4.2. Ação da leptolisina sobre a microcirculação por microscopia intravital**

Esse procedimento foi realizado de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto Butantan (CEUA N° 4505190318) e do ICB-USP (CEUA N° 6048190318). O método foi realizado em um microscópio vertical (Axiolab, Carl Zeiss) acoplado a uma câmera digital para aquisição de imagens (AxioCam Icc1, Carl Zeiss). Camundongos Balb/c machos (6-8 semanas de idade) foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (100 mg/kg) e cloridato de xilazina (10 mg/kg) e colocados sobre uma almofada de aquecimento a 37°C. Fez-se uma incisão na pele (região escrotal) e o músculo cremáster foi exteriorizado. Uma incisão longitudinal no músculo permitiu sua exposição e acesso à rede microcirculatória (PERAZZO et al., 2017). Diferentes quantidades de leptolisina recombinante (0,5 µg, 0,25 µg e 0,1 µg) foram administradas topicamente sobre o músculo cremáster dos camundongos. Como controle administrou-se PBS. Três animais foram avaliados para cada dose de leptolisina testada. Vênulas pós-capilar variando de 25 a 40 µm de diâmetro em cada animal foram escolhidas para realização da contagem do número de leucócitos rolantes, definida como o número de glóbulos brancos que passaram por um ponto fixo pré-definido durante 1 min. Antes da aplicação de cada dose de leptolisina, foi feita uma contagem de leucócitos rolantes e uma observação de toda microcirculação do animal testado. Após a aplicação da proteína, a cada 10 min foram contados os leucócitos, observando-se seu comportamento de adesão, presença de hemorragia e transmigração

para o tecido. Cada animal foi avaliado por 30 min. Finda a análise, aprofundou-se a anestesia para eutanásia dos animais com 3 vezes a dose anestésica.

### 3.5. CARACTERIZAÇÃO DA CEPA NOCAUTE PARA LEPTOLISINA (*L. INTERROGANS* MANILAE L495 $\Delta$ LIC13434)

#### 3.5.1. Obtenção da cepa nocaute

A cepa nocaute para leptolisina foi obtida por troca alélica, de acordo com a metodologia descrita por WUNDER et al., 2016. O procedimento foi realizado pelo grupo do Dr. Elsie Wunder, na Universidade de Yale, EUA.

#### 3.5.2. Infecção de hamsters

Inicialmente, hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) machos recém-desmamados com aproximadamente 50 g foram inoculados intraperitonealmente com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  ou  $10^4$  leptospiras nocauteou selvagens (5 animais por grupo). Os animais foram acompanhados durante 16 dias após a infecção. A eutanásia dos sobreviventes foi feita com sobredose anestésica de acordo com as normas aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUAIB N° 6453310521).

Uma infecção por via epicutânea, após escarificação da pele, também foi realizada pelo grupo do Dr. Elsie Wunder, Universidade de Yale, colaborador deste projeto. Neste caso, hamsters sírios recém-desmamados (4 animais por grupo) tiveram seus flancos raspados 1 dia antes da inoculação. No dia do desafio, cada animal foi anestesiado com isofluorano e uma área de aproximadamente 3–4 cm<sup>2</sup> do flanco previamente depilado foi raspada suavemente com uma lâmina de bisturi cirúrgico para danificar levemente a camada mais externa da pele (estrato córneo), segundo metodologia previamente descrita (GOSTIC et al., 2019; ZHANG et al., 2012). Um volume de 50 µL de meio EMJH com  $10^3$  leptospiras foi inoculado sobre a área abrasada, seguido da aplicação imediata de um curativo de filme transparente (Tegaderm, 3M) para cobrir e manter o inóculo no local por 5 min.

Após a retirada do curativo, a área foi lavada delicadamente com água destilada. Os hamsters foram monitorados duas vezes ao dia até 21 dias após a infecção. O ponto final humanitário adotado para os hamsters incluiu sinais de doença e morte. Os animais sobreviventes ao final do experimento ou moribundos apresentando sinais clínicos da doença foram eutanasiados.

### **3.5.3. Ensaio *in vitro* de translocação por monocamadas polarizadas de células MDCK**

Este ensaio de translocação foi realizado como descrito por Figueira e colaboradores (FIGUEIRA et al., 2011) com algumas modificações. Células MDCK ( $2 \times 10^5$  células em 500  $\mu$ L de DMEM) foram semeadas em unidades de filtro Transwell de 12 mm de diâmetro com poros de 3  $\mu$ m (Costar). As monocamadas foram incubadas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> por 3 a 4 dias com mudanças diárias do meio até que a resistência transepitelial (TER) atingisse uma faixa de 200 - 300  $\Omega$ /cm<sup>2</sup>, medida com um voltômetro epitelial (EVOM, World Precision Instruments). A TER para filtros de polycarbonato sem células foi de aproximadamente 100  $\Omega$ /cm<sup>2</sup>. À câmara superior do Transwell foram adicionadas leptospiros (*L. interrogans* Manilae L495, *L. interrogans* Manilae L495  $\Delta$ *lic13434* e *L. biflexa* Patoc) em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 100. As bactérias foram ressuspensas em 500  $\mu$ L na proporção 1:2 v/v dos meios DMEM e EMJH. Alíquotas foram removidas da câmara inferior (100  $\mu$ L) após 1, 3, 6 e 8 h e o número de leptospiros foi contado em triplicata usando a câmara de Petroff-Hausser (Fisher Scientific). A capacidade das leptospiros de translocar monocamadas polarizadas de MDCK foi determinada calculando-se a proporção de leptospiros na câmara inferior em comparação com os inóculos iniciais. Dois ensaios foram realizados para cada cepa testada.

### **3.5.4. Avaliação da carga bacteriana nos rins por PCR quantitativa em tempo real**

A PCR quantitativa em tempo real foi realizada em um ABI 7500 (Applied Biosystems) com Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen Corporation), como descrito por WUNDER et al., 2016. O gene *lipL32*, bastante conservado em leptospiros patogênicos, foi amplificado

conforme protocolo previamente descrito (STODDARD et al., 2009). O gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*) de hamster foi usado como um controle para monitorar a eficiência da extração de ácido nucleico e avaliar uma eventual inibição da reação de amplificação. Amostras com valores de Ct entre 16 e 21 foram consideradas positivas e posteriormente analisadas por PCR em tempo real para detecção de *lipL32*. O DNA dos rins de cada animal foi extraído e a PCR em tempo real foi realizada em duplicata, incluindo uma curva padrão de DNA genômico de *L. interrogans* sorovar FioCruz L1-130 ( $10^0$ – $10^7$  leptospiras) e 12 poços de controle negativo (água) por placa. Considerando a quantidade de tecido utilizada para extração de DNA, uma equação foi aplicada para expressar os resultados como o número de leptospiras por grama de tecido.

### 3.6. AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LEPTOLISINA EM AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM LEPTOSPIROSE

Esse estudo foi feito pelo grupo do Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva, da FioCruz, RJ, com quem colaboramos há cerca de 4 anos. As amostras utilizadas fazem parte de um estudo mais amplo, autorizado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz sob a identificação CAAE 31405820.8.0000.5262. Por ELISA, avaliou-se a reatividade do soro de 17 pacientes positivos para leptospirose em testes de microaglutinação microscópica (MAT) (títulos de 1:1.600 até 1:12.800), e 6 pacientes com outros quadros febris, não reativos para leptospirose em testes de MAT. Poços de placas de 96 poços foram revestidos com 150 ng de leptolisina recombinante. Após bloqueio com PBS-leite desnatado 10 %, os soros diluídos 1:100 em PBS-leite desnatado 5 % foram adicionados. Após 1 h de incubação, foram feitas 3 lavagens com PBS-T e foi adicionado anti-IgG humano conjugado a peroxidase. Após lavagens foi feita revelação e leitura da absorbância a 450 nm.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ANÁLISES *IN SILICO*

#### 4.1.1. Análises comparativas

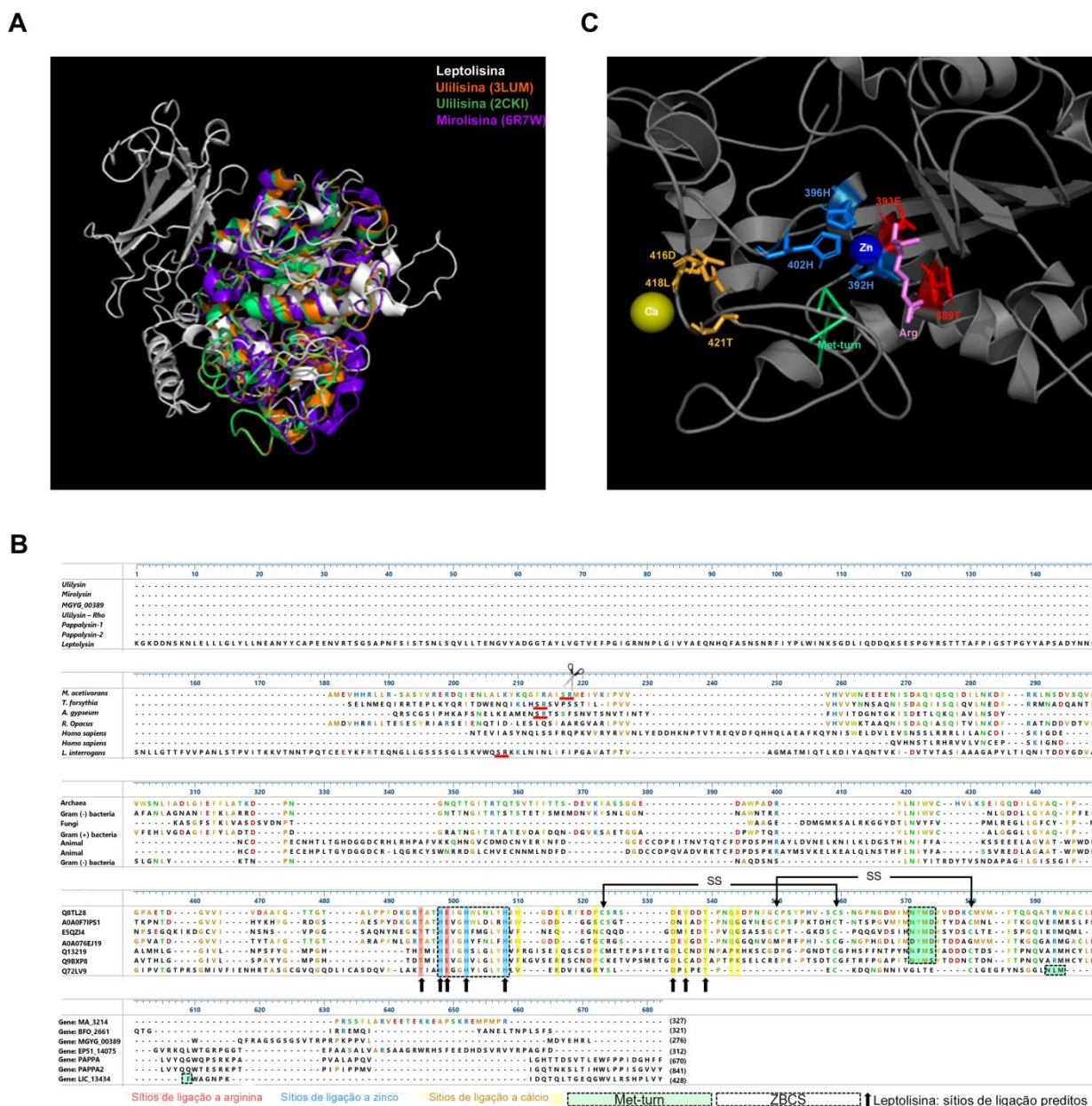
Um modelo estrutural 3D da leptolisina de *L. interrogans* foi gerado por modelagem comparativa usando a proteína ulilisina de *Methanosarcina acetivorans*, que abriga um domínio papalisina-1. O modelo obtido foi então alinhado à ulilisina de *Methanosarcina acetivorans* (PDB: 3LUM e 2CKI) e à mirolisina madura de *Tannerella forsythia* (6R7W). A sobreposição das três estruturas cristalográficas revela semelhanças no enovelamento das proteínas em suas regiões C-terminais, que abrigam o domínio catalítico (Figura 4A). O alinhamento das sequências dessas três metaloproteases da família M43 indica que a ulilisina e a mirolisina apresentam um sítio de clivagem autolítica para sua ativação, sublinhado em vermelho (tesouras indicam a clivagem da ligação peptídica Ser-Arg que permite a remoção do pró-domínio N-terminal (Figura 4B). Curiosamente, a leptolisina também apresenta um sítio Ser-Arg na posição 230, mas parece que essa protease não sofre clivagem autolítica, conforme discutido adiante.

A predição dos sítios de ligação da leptolisina a cálcio, zinco e arginina foi realizada usando o servidor Coach. Os resíduos 416D, 418L e 421T foram preditos como locais de ligação a cálcio, enquanto as histidinas (H) nas posições 392, 396 e 402 foram preditas como locais de ligação a zinco, e os resíduos 389T e 393E como locais de ligação a arginina (Figura4C). O alinhamento da leptolisina de *L. interrogans* com metaloproteases M43B de *Archaea* (*M. acetivorans*), bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (*T. forsythia* e *R. opacus*, respectivamente), fungos (*A. gypseum*) e *Homo sapiens* revela a sequência consenso estendida ligação ao zinco (ZBCS, HEXXHXXGXXH/D) altamente conservada, e corrobora a predição dos resíduos 416D e 421T da leptolisina como sítios de ligação a cálcio, uma vez que são conservados e já caracterizados nas demais proteínas. Além disso, os dados sugerem que os aminoácidos <sub>450</sub>-NLMF-<sub>453</sub> correspondem ao *methionine-containing 1,4-β-turn* (Met-



*turn*) da leptolisina. Embora não esteja perfeitamente alinhado com o *Met-turn* das proteínas comparadas, sua localização abaixo do sítio de ligação a zinco na estrutura 3D sugere fortemente sua identificação como uma estrutura *Met-turn* (Figura 4B). Os resíduos de cisteína envolvidos na formação de pontes dissulfeto na mirolisina e ulilisina não são totalmente conservados na leptolisina.

**Figura 4.** Análise comparativa de papalinas curtas

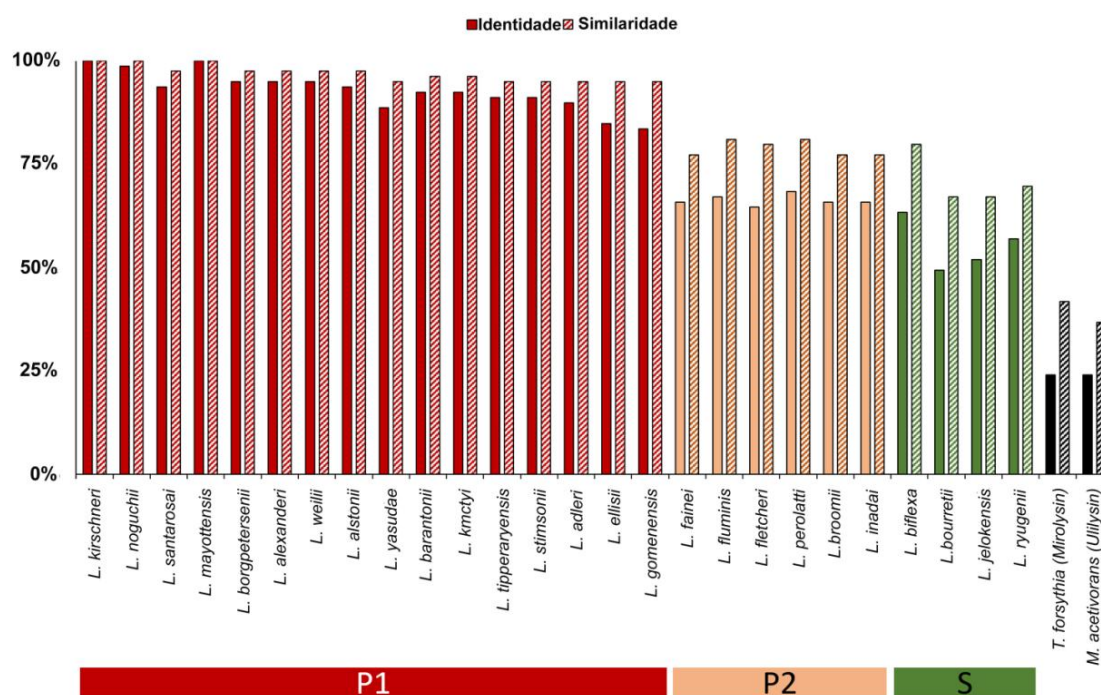


(A) Estrutura 3D da leptolisina alinhada estruturalmente à uliisina 3LUM (laranja) e 2CKI (verde) e mirolisina (roxo); (B) Alinhamento de metaloproteases M43: leptolisina de *L. interrogans*, uliisina de *M. acetivorans*, mirolisina de *T. forsythia*, uliisina de *R. opacus*, metaloprotease extracelular MGYG\_00389 de *A. gypseum* e papalinas-1 e papalinas-2 de *H. sapiens* foram alinhadas pelo programa Muscle. A sequência consenso de ligação a zinco (ZBCS) aparece dentro de uma caixa com linha pontilhada. Os sítios de ligação a arginina (vermelho), zinco (azul) e cálcio (amarelo) são destacados, assim como os resíduos correspondentes específicos da leptolisina (setas pretas). O Met-turn, em uma caixa, é destacado em verde. As linhas vermelhas indicam resíduos de Serina-Arginina, local de clivagem autolítica da uliisina e mirolisina. As pontes dissulfeto da uliisina (SS) são indicadas por setas acima das cisteínas. (C) Sítios de ligação previstos para leptolisina de *L. interrogans*: sítios de ligação a cálcio são indicados em amarelo-ouro, sítios de ligação a zinco são indicados em azul e sítios de ligação a arginina são destacados em vermelho. O Met-turn é mostrado em verde. Os ligantes cálcio (Ca) e zinco (Zn) são representados por esferas amarelas e azuis, respectivamente, enquanto a arginina (Arg) é indicada por bastões rosa.

#### 4.1.2. O domínio catalítico da leptolisina é altamente conservado entre espécies patogênicas de *Leptospira*

A conservação de sequência do domínio catalítico da leptolisina foi avaliada em 17 espécies patogênicas do subclado P1, 6 espécies do subclado P2 e 4 espécies saprófitas (clado S). Todas as sequências selecionadas foram comparadas com a proteína de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (WP\_000914951.1). Um maior grau de conservação foi observado entre leptospiros patogênicos do subclado P1 (84% – 100% de identidade, 95% – 100% de similaridade). Como esperado, o domínio catalítico da leptolisina é menos conservado entre as espécies do subclado P2 (65% - 68% e 77% - 81% de identidade e similaridade, respectivamente) e entre as leptospiros saprófitas (49% - 63% de identidade e 67% - 80% de similaridade). Os domínios catalíticos da mirolisina e da ulilisina compartilham apenas 25% de identidade e 42% e 37% de similaridade, respectivamente, com o domínio catalítico da leptolisina de *L. interrogans* L1-130 (Figura 5).

**Figura 5.** Conservação do domínio catalítico da leptolisina entre espécies de *Leptospira*



O alinhamento de sequências do domínio catalítico da leptolisina foi realizado com o programa Muscle, e incluiu 17 espécies de *Leptospira* do subclado P1, 6 espécies do subclado P2, 3 espécies do subclado S1 e 1 espécie do subclado S2. Os domínios catalíticos da mirolisina e ulilisina também foram incluídos. Semelhanças são apresentadas como um valor percentual em relação à sequência da proteína de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (WP\_000914951.1).

O alinhamento de sequências mostra que o ZBCS estendido, o *Met-turn* e os sítios de ligação a cálcio, zinco e arginina da leptolisina são bem conservados entre as espécies de todos os subclados de *Leptospira* (Figura 6A). No entanto, resíduos não conservados no domínio catalítico de leptolisinas dos subclados P2 e S também são observados: lisinas (K) nas posições 388, 406 e 410, glutamina (Q) na posição 427 e glicina (G) na posição 434 são conservadas apenas entre as espécies do subclado P1 (Figura 6A). Considerando a proximidade desses resíduos específicos aos sítios de ligação a cálcio, zinco e arginina e ao *Met-turn* (Figura 6B), investigamos se essas alterações de aminoácidos afetariam a estabilidade da proteína. Curiosamente, quinze das dezessete variantes encontradas nas leptolisinas P2 e S nas posições K388, K406, K410, Q427 e G434 foram preditas como desestabilizadoras, resultando em variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ) negativa (Tabela 4). Por outro lado, as variantes K410E e K410D encontradas em leptolisinas P1 foram preditas como estabilizadoras, o que sugere fortemente a manutenção da estrutura do sítio catalítico.



**Figura 6.** Análise comparativa do domínio catalítico da leptolisina

**A**

P1	<i>L. interrogans</i>	A	K	T	I	A	H	E	G	G	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	S	L	D	P	P	E	T	E	C	---	K	D	Q	---	N	G	N	N	I	V	G	L	T	E	C	L	G	E	G	F	Y	N	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	K	I	D	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V										
	<i>L. kirschneri</i>	A	K	T	I	A	H	E	G	G	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	S	L	D	P	P	E	T	E	C	---	K	D	Q	---	N	G	N	N	I	V	G	L	T	E	C	L	G	E	G	F	Y	N	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	K	I	D	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V										
	<i>L. noguchii</i>	A	K	T	I	A	H	E	G	G	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	S	L	D	P	P	E	T	E	C	---	K	D	Q	---	N	G	N	N	I	V	G	L	T	E	C	L	G	E	G	F	Y	N	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	K	I	D	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V										
	<i>L. santarosai</i>	A	K	T	I	A	H	E	A	G	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	S	L	D	P	P	E	T	E	C	---	K	D	Q	---	N	G	N	N	V	G	L	G	E	C	L	G	E	G	F	Y	D	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	K	I	N	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V											
	<i>L. mayottensis</i>	A	K	T	I	A	H	E	G	G	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	S	L	D	P	P	E	T	E	C	---	K	D	Q	---	N	G	N	N	I	V	G	L	T	E	C	L	G	E	G	F	Y	N	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	K	I	D	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V										
	<i>L. borgpetersenii</i>	A	K	T	I	A	H	E	A	G	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	S	L	D	P	P	E	T	E	C	---	K	D	Q	---	N	G	N	N	I	V	G	L	G	E	C	L	G	E	G	F	Y	D	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	K	I	N	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V										
	<i>L. alexanderi</i>	A	K	T	I	A	H	E	A	G	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	S	L	D	P	P	E	T	E	C	---	K	D	Q	---	N	G	N	N	I	V	G	L	G	E	C	L	G	E	G	F	Y	D	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	K	I	N	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V										
	<i>L. weilii</i>	A	K	T	I	A	H	E	A	G	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	S	L	D	P	P	E	T	E	C	---	K	D	Q	---	N	G	N	N	I	V	G	L	G	E	C	L	G	E	G	F	Y	D	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	K	I	N	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V										
	<i>L. alstonii</i>	A	K	T	I	A	H	E	A	G	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	S	L	D	P	P	E	T	E	C	---	K	D	Q	---	N	G	N	N	I	V	G	L	G	E	C	L	G	E	G	F	Y	D	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	K	I	N	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V										
	<i>L. yasudae</i>	A	K	T	I	A	H	E	G	A	H	F	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	T	L	D	P	P	E	T	E	C	---	R	D	Q	---	N	G	N	N	L	V	G	L	G	E	C	L	G	D	G	F	F	N	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	T	I	N	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V									
	<i>L. barantonii</i>	A	K	T	I	A	H	E	G	G	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	S	L	D	P	P	E	T	E	C	---	R	D	Q	---	N	G	N	N	L	V	G	L	G	E	C	L	G	D	G	F	F	N	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	T	I	N	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V										
	<i>L. kmetyi</i>	A	K	T	I	A	H	E	G	G	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	S	L	D	P	P	E	T	E	C	---	R	D	Q	---	N	G	N	N	L	V	G	L	G	E	C	L	G	D	G	F	F	N	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	T	I	N	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V										
	<i>L. tipperaryensis</i>	A	K	T	I	A	H	E	G	A	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	S	L	D	P	P	E	T	E	C	---	Q	D	Q	---	N	G	N	N	L	V	G	L	G	E	C	L	T	G	F	F	N	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	T	I	N	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V											
<i>L. stimsonii</i>	A	K	T	I	A	H	E	G	A	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	S	L	D	P	P	E	T	E	C	---	Q	D	Q	---	N	G	N	N	L	V	G	L	G	E	C	L	T	G	F	F	N	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	T	I	N	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V												
<i>L. adleri</i>	A	K	T	I	A	H	E	G	A	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	R	Y	S	L	D	P	P	E	T	E	C	---	Q	D	Q	---	N	G	N	N	L	V	G	L	G	E	C	L	T	G	F	F	N	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	T	I	N	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V												
<i>L. ellisii</i>	A	K	T	I	A	H	E	G	A	H	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	M	S	F	T	D	P	P	E	T	E	C	---	R	D	Q	---	N	G	N	D	F	I	G	L	G	E	C	L	G	E	G	F	F	N	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	E	I	N	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V											
<i>L. gomenensis</i>	A	K	T	I	A	H	E	G	A	H	F	L	G	L	L	V	E	K	D	V	I	K	G	-----	M	S	F	T	D	P	P	E	T	E	C	---	R	D	Q	---	N	G	N	D	F	I	G	L	G	E	C	L	G	E	G	F	F	N	S	G	G	L	N	L	M	F	W	A	G	N	P	E	I	N	Q	T	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	H	P	L	V										
P2	<i>L. fainei</i>	A	N	T	I	A	H	E	G	S	H	F	L	G	L	L	P	A	E	I	D	Q	S	S	Q	-----	V	Y	-	V	D	P	P	E	T	E	C	---	R	N	P	---	G	S	N	G	K	L	I	N	N	C	S	G	T	G	F	F	N	S	G	A	L	N	L	M	F	P	L	G	N	A	S	V	D	S	Q	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	N	P	L	S									
	<i>L. fluminis</i>	A	N	T	I	A	H	E	G	S	H	F	L	G	L	L	P	V	E	I	D	Q	S	S	S	Q	-----	V	Y	-	V	D	P	P	E	T	E	C	---	R	N	P	---	G	T	N	G	Q	I	T	I	S	G	C	L	G	S	G	F	F	N	S	G	A	L	N	L	M	F	P	L	G	N	A	S	V	N	Q	S	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	N	P	L	A							
	<i>L. fletcheri</i>	A	N	T	I	A	H	E	G	S	H	F	L	G	L	L	P	V	E	I	D	Q	S	S	S	Q	-----	V	Y	-	V	D	P	P	E	T	E	C	---	R	N	P	---	G	T	N	G	Q	I	T	I	S	G	C	L	G	S	G	F	F	N	S	G	A	L	N	L	M	F	P	L	G	N	A	S	V	N	Q	S	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	N	P	L	A							
	<i>L. perolatii</i>	G	N	T	I	A	H	E	G	S	H	F	L	G	L	L	P	V	E	I	D	Q	S	S	S	Q	-----	V	F	-	K	D	P	P	E	T	E	C	---	H	D	A	---	N	G	N	G	S	I	S	I	S	E	C	L	G	A	G	F	F	N	S	G	A	L	N	L	M	F	P	L	G	S	G	N	I	D	Q	S	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	N	P	L	V							
	<i>L. broomii</i>	A	N	T	I	A	H	E	G	S	H	F	L	G	L	L	P	V	E	I	D	Q	S	S	S	Q	-----	V	Y	-	V	D	P	P	E	T	E	C	---	R	N	P	---	G	S	N	G	K	L	I	N	N	C	L	T	G	F	F	N	S	G	A	L	N	L	M	F	P	L	G	N	V	S	D	S	Q	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	N	P	L	S										
<i>L. inadai</i>	A	N	T	I	A	H	E	G	S	H	F	L	G	L	L	P	V	E	I	D	Q	S	S	S	Q	-----	V	Y	-	V	D	P	P	E	T	E	C	---	R	N	P	---	G	S	N	G	K	L	I	N	N	C	L	T	G	F	F	N	S	G	A	L	N	L	M	F	P	L	G	N	A	S	V	D	S	Q	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	S	N	P	L	S										
S	<i>L. biflexa</i>	G	N	T	I	A	H	E	A	G	H	F	L	G	L	L	V	N	E	R	---	T	G	A	T	N	A	S	I	N	Y	V	D	P	I	E	T	P	K	C	M	A	A	H	N	V	---	N	G	N	G	V	D	I	S	E	C	L	G	T	G	F	F	N	S	G	A	L	N	L	M	F	W	A	G	D	G	V	T	N	Q	S	L	T	G	E	Q	G	W	L	R	R	N	P	L	A				
	<i>L. bouretii</i>	G	N	T	I	A	H	E	A	G	H	F	L	G	L	L	V	T	S	E	S	---	A	G	S	T	S	T	S	G	L	N	Y	T	R	D	P	I	E	T	P	Y	C	G	T	A	R	A	S	F	L	V	N	D	G	I	A	P	Q	E	C	L	G	T	G	I	D	A	S	G	Y	N	M	M	F	W	A	S	D	G	V	T	N	Q	S	L	T	G	E	Q	G	W	I	I	R	R	N	P	L	A
	<i>L. jetokensis</i>	G	E	T	L	S	H	E	A	G	H	F	L	G	L	L	V	T	S	E	S	---	S																																																																													

**Table 4.** Efeitos das variações nos resíduos na estabilidade do sítio catalítico da leptolisina

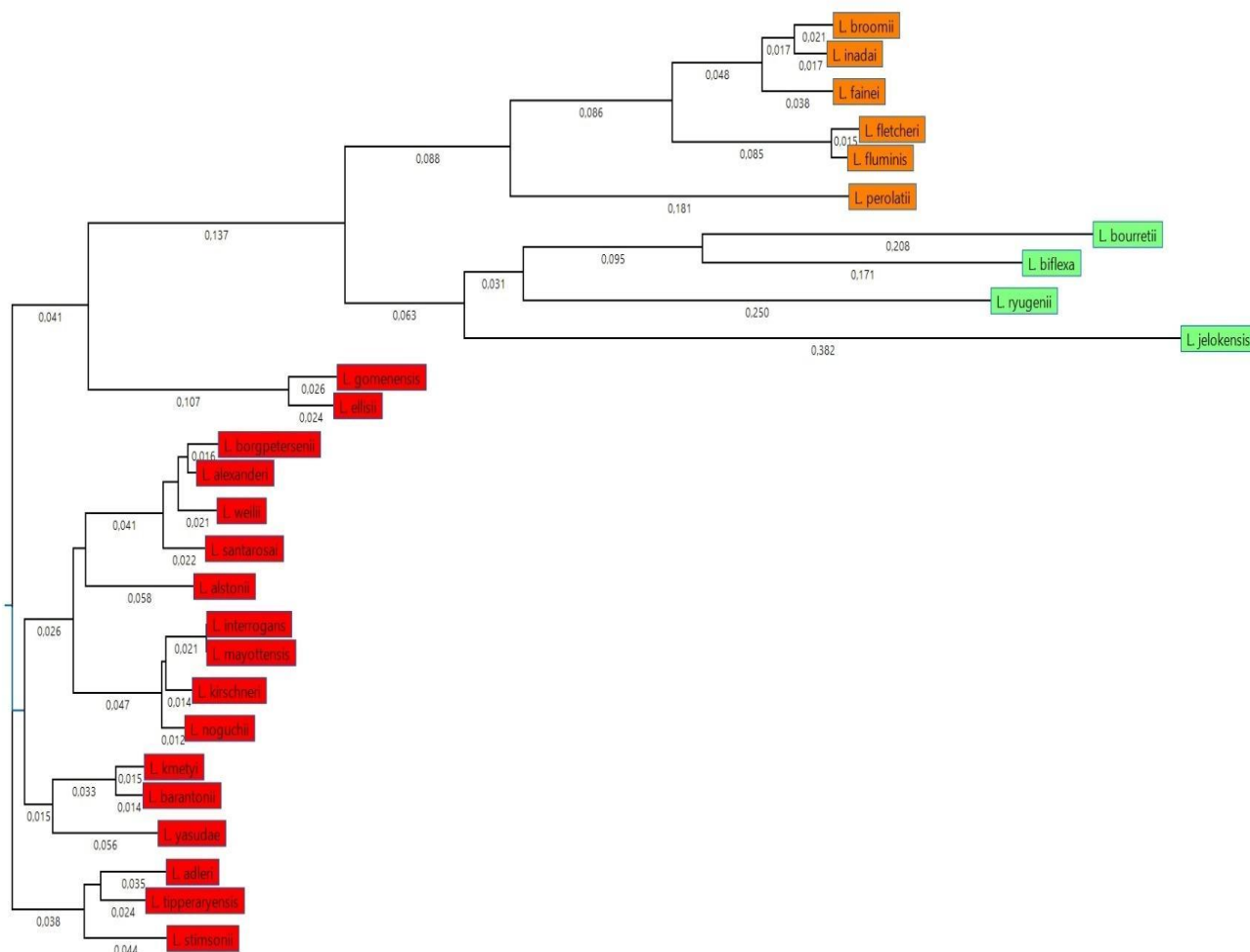
Posição	P1 (resíduo)	Substituição	Encontrado em	$\Delta\Delta G^*$ (kcal/mol)	Efeito
388	K	N	P2 ; S	-1.402	<b>Desestabilizante</b>
		E	S	-1.477	<b>Desestabilizante</b>
		D	S	-0.797	<b>Desestabilizante</b>
406	K	I	P2	0.599	Estabilizante
		R	S	-0.272	<b>Desestabilizante</b>
		S	S	-1.51	<b>Desestabilizante</b>
410	K	S	P2 ; S	-0.05	<b>Desestabilizante</b>
		E	P1	0.494	Estabilizante
		D	P1	0.475	Estabilizante
427	Q	P	P2	-0.243	<b>Desestabilizante</b>
		A	P2	-0.401	<b>Desestabilizante</b>
		V	S	0.286	Estabilizante
		S	S	-0.907	<b>Desestabilizante</b>
		T	S	-0.449	<b>Desestabilizante</b>
434	G	T	P2	-1.205	<b>Desestabilizante</b>
		S	P2	-1.397	<b>Desestabilizante</b>
		D	S	-0.815	<b>Desestabilizante</b>
		A	S	-0.811	<b>Desestabilizante</b>
		E	S	-0.79	<b>Desestabilizante</b>

\*  $\Delta\Delta G$  indica a mudança prevista na energia livre de dobramento com o resíduo modificado (kcal/mol). Um valor negativo corresponde a um resíduo previsto como desestabilizador da estrutura da proteína (negrito), enquanto um valor positivo corresponde a um resíduo previsto como tendo um efeito estabilizador.

P1: patogênicas, P2: intermediárias, S: saprófitas

Uma árvore filogenética baseada nas sequências de aminoácidos das proteínas comparadas foi construída utilizando o algoritmo BIONJ e permitiu agrupar os subclados P2 e S como grupos monofiléticos, filogeneticamente mais próximos entre si, que o subclado P1. Este, por sua vez, apresentou-se como um grupo polifilético, uma vez que *L. gomenensis* e *L. eliisi*, espécies que apresentaram menor similaridade de suas proteínas em comparação a *L. interrogans* (67,3% e 67,5%, respectivamente), agrupam-se num ramo isolado nesta árvore (Figura 7).

**Figura 7.** Árvore filogenética construída com base nas sequências das proteínas homólogas a leptolisina



No gráfico, as cores de preenchimento das caixas com os nomes das espécies indicam sua classificação como leptospiras patogênicas (subclado P1 - caixas vermelhas), de patogenicidade intermediária (subclado P2 - caixas laranjas) e espécies saprófitas (clado S - caixas verdes).

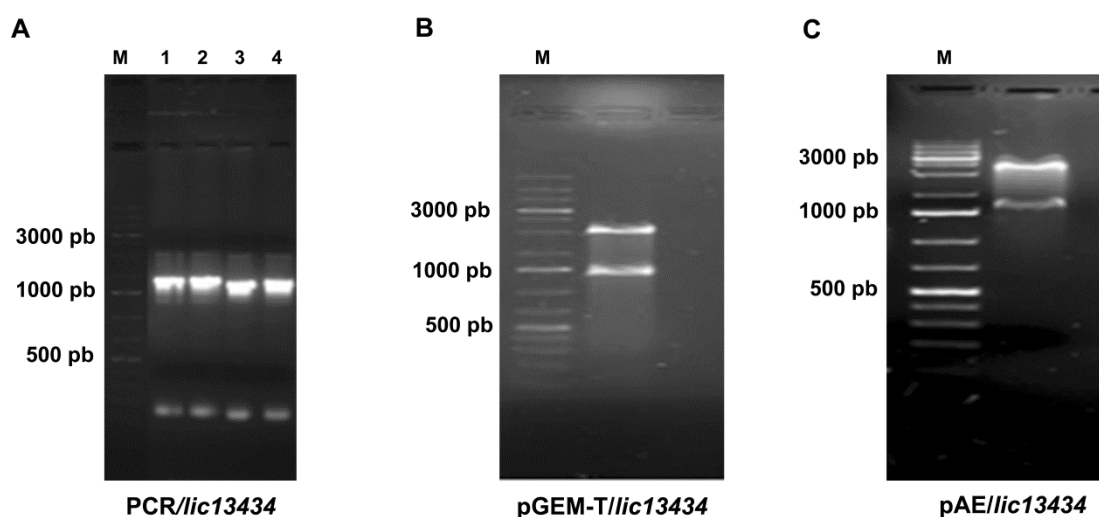
## 4.2. PRODUÇÃO DA LEPTOLISINA RECOMBINANTE

### 4.2.1. Clonagem do gene que codifica a leptolisina

O gene que codifica a leptolisina (*lic13434*) foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* Copenhageni estirpe 10A e o produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%. Um fragmento de 1377 pares de bases correspondendo ao gene (sem a região que codifica o peptídeo sinal) foi devidamente amplificado (Figura 8A). Os fragmentos foram purificados do gel e clonados no vetor pGEM-T easy. A dupla digestão com as enzimas *NcoI* e *BamHI* gerou um

inserto do tamanho esperado (1377 pb) e um vetor vazio também do tamanho esperado (3015 pb) (Figura 8B). Por fim, o inserto foi subclonado no vetor de expressão pAE. Após digestão com as mesmas enzimas confirmou-se a presença do inserto subclonado com o tamanho correto (Figura 8C). As construções obtidas foram sequenciadas com primers M13 F/R que seanelam no vetor à montante e à jusante do inserto, a fim de se verificar a eventual presença de mutações. Os clones sem mutações ou quaisquer alterações foram selecionados para as etapas subsequentes.

**Figura 8.** Clonagem do gene que codifica a leptolisina (*lic13434*)



(A) Amplificação por PCR. Fragmentos amplificados por PCR (1 – 4) a partir do DNA genômico de *L. interrogans* Copenhageni (1377 pb). (B) Clonagem do gene no vetor pGEM-T. O vetor foi digerido com as enzimas *NcoI* e *BamHI* liberando o inserto de 1377 pb. (C) Clonagem do gene no vetor de expressão pAE. O vetor foi digerido com as enzimas *NcoI* e *BamHI* liberando o inserto de 1377 pb. M: marcador de massa molecular (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen); pb: pares de base.

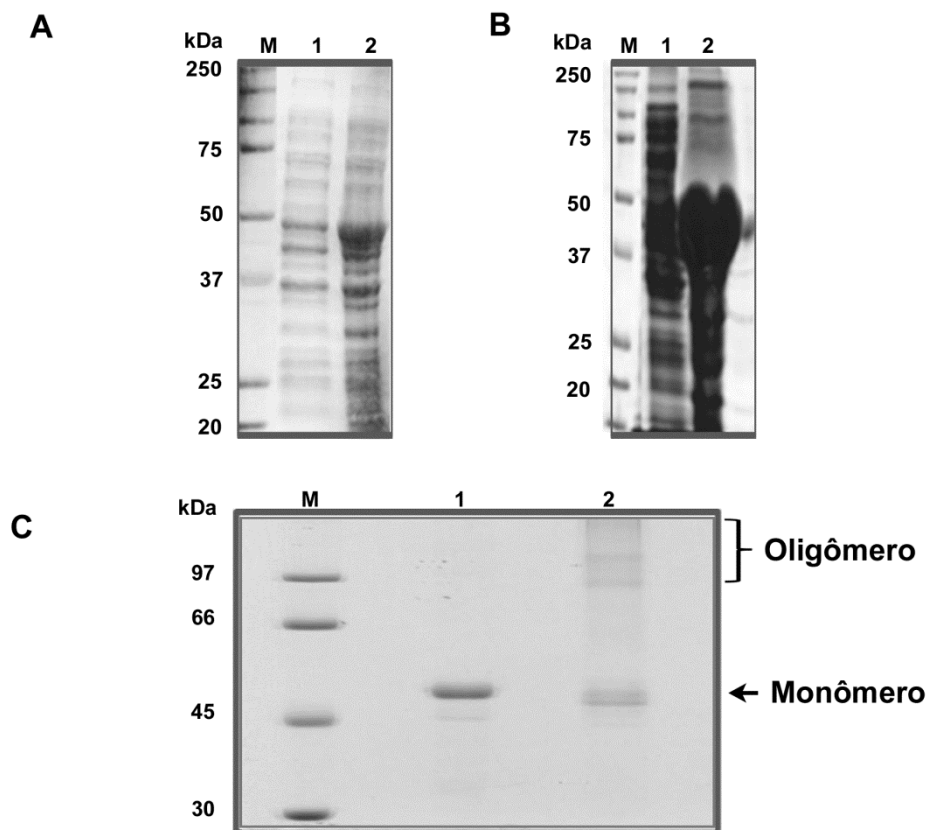
#### 4.2.2. Expressão e purificação da leptolisina

Para a expressão da leptolisina recombinante foi utilizada a cepa *E. coli* BL21(DE3). A proteína foi expressa na fração insolúvel, na forma de corpúsculos de inclusão. Assim sendo, a aplicação



tecnologia de alta pressão (TPA) se apresentou como uma opção eficiente na obtenção da proteína funcional a partir de corpúsculos de inclusão. Diferentemente de protocolos tradicionais, trata-se de uma técnica branda de renaturação que promove a solubilização de agregados proteicos, conservando as estruturas secundária e terciária semelhantes às das proteínas nativas, estruturas estas que em geral estão presentes nos corpúsculos de inclusão. Assim, quando são aplicadas pressões da ordem de 2-3 kbar, os agregados proteicos podem ser dissociados em condições brandas, desfavorecendo interações intermoleculares hidrofóbicas e eletrostáticas, evitando a necessidade de utilização de altas concentrações de reagentes desnaturantes para a dissociação de proteínas agregadas e mantendo as estruturas semelhantes às nativas. Após pressurização, a proteína renaturada foi purificada em coluna de exclusão molecular. A análise da expressão e da purificação foi feita em gel SDS-PAGE (Figura 9). Uma banda forte de ~ 52 kDa pode ser visualizada na fração induzida e na fração insolúvel do lisado bacteriano (Figura 9A e B). Após purificação, verifica-se no gel uma proteína pura, mas bem menos concentrada (0,1 µg/µL) (Figura 9C). Embora os resíduos de cisteína não sejam totalmente conservados na leptolisina, a formação de pontes dissulfeto intra e intermoleculares não pode ser descartada, uma vez que a proteína migra um pouco mais rápido como monômero, mas também forma homo-oligômeros sob condições não redutoras (Figura 9C).

**Figura 9.** Análise da expressão e purificação da leptolisina recombinante



(A) Controle não induzido (1) e induzido (2) da proteína em *E. coli* BL21 DE3. (B) Frações solúvel (1) e insolúvel (2) do lisado bacteriano após passagem no *French press*. (C) Leptolisina recombinante purificada analisada sob condições redutoras (1) e não redutoras (2). As proteínas foram analisadas por SDS-PGE-12 % e coradas com Coomassie Brilliant Blue. Proteína purificada (~ 52 kDa). M (A e B): Marcador Kaleidoscope (Invitrogen). M (C): Marcador LMW (Sigma).

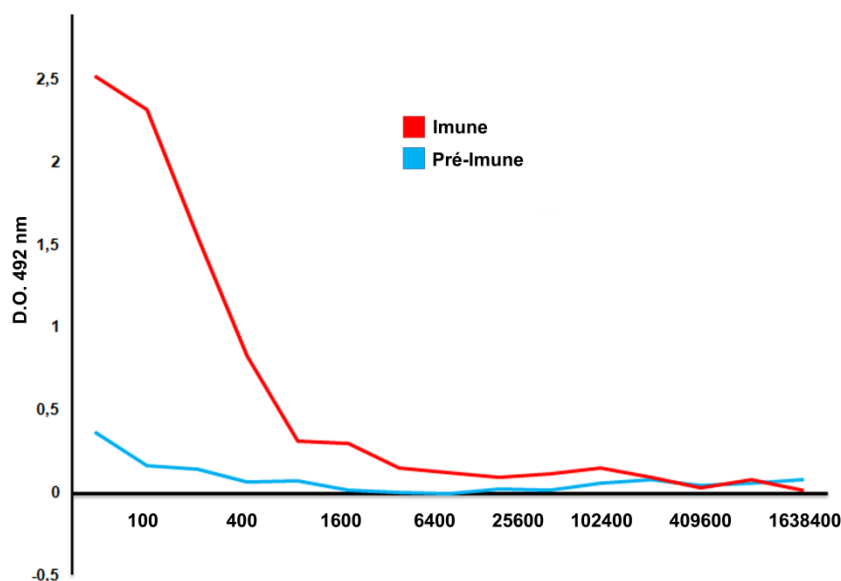
#### 4.3. DETECÇÃO DA LEPTOLISINA NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE *LEPTOSPIRA*

##### 4.3.1. Produção de soro policlonal contra a leptolisina em coelho e determinação do título de anticorpos

Para obtenção de soro policlonal contra leptolisina, quatro imunizações realizadas com intervalos de 15 dias foram feitas em coelho. Foram realizadas duas coletas de sangue: uma antes das imunizações para obtenção de soro pré-imune e outra 15 dias após a última imunização para obtenção do soro imune. Os soros foram preparados após cada sangria e analisados por ELISA para obtenção

dos títulos de anticorpos (Figura 10). A leptolisina foi capaz de induzir a produção de anticorpos IgG específicos e o soro imune apresentou um título de anticorpos de aproximadamente 1:6.400.

**Figura 10.** Determinação dos títulos de anti-leptolisina

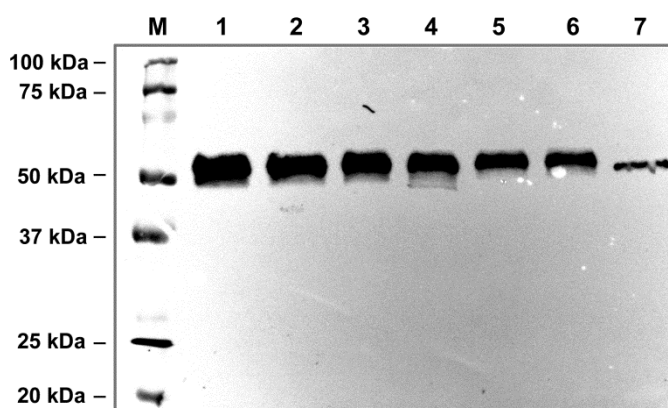


Um coelho macho recebeu 4 imunizações com intervalos de 15 dias. O soro pré-imune foi utilizado como controle. A determinação dos títulos de anticorpos foi feita por ELISA, com leitura da absorvância a 492 nm.

#### 4.3.2. Detecção da leptolisina no sobrenadante de cultura de *Leptospira*

Como a leptolisina possui um peptídeo sinal para secreção, a produção da proteína por sorovares de *Leptospira* pertencentes a diferentes espécies foi avaliada por *immunoblotting* usando sobrenadantes de cultura e o antissoro produzido em coelho. Tanto leptospiros patogênicas quanto saprófitas produzem leptolisina, visualizada como uma banda de ~ 50 kDa em todas as canaletas (Figura 11). Aparentemente, há uma maior produção de leptolisina pelas estirpes virulentas (1 e 2).

**Figura 11.** Detecção da leptolisina nos sobrenadantes de cultura de diferentes espécies de *Leptospira*



Cinco  $\mu\text{g}$  de sobrenadantes de cultura de diferentes estirpes de *Leptospira* (obtidos a partir de  $1 \times 10^9$  bactérias) foram submetidos a SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anti-leptolisina (1:500) e anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:5.000). (1) *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni Fiocruz L1-130, (2) *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki Fromm, (3) *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni 10A, (4) *Leptospira kirschneri* sorovar Cynopteri 3522C, e as saprófitas (5) *Leptospira biflexa* sorovar Andamana CH11 e (6) *Leptospira biflexa* sorovar Patoc Patoc I; (7) Leptolisina recombinante. M: Marcador Kaleidoscope (Invitrogen).

#### 4.4. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA LEPTOLISINA DE *L. INTERROGANS* POR FRET

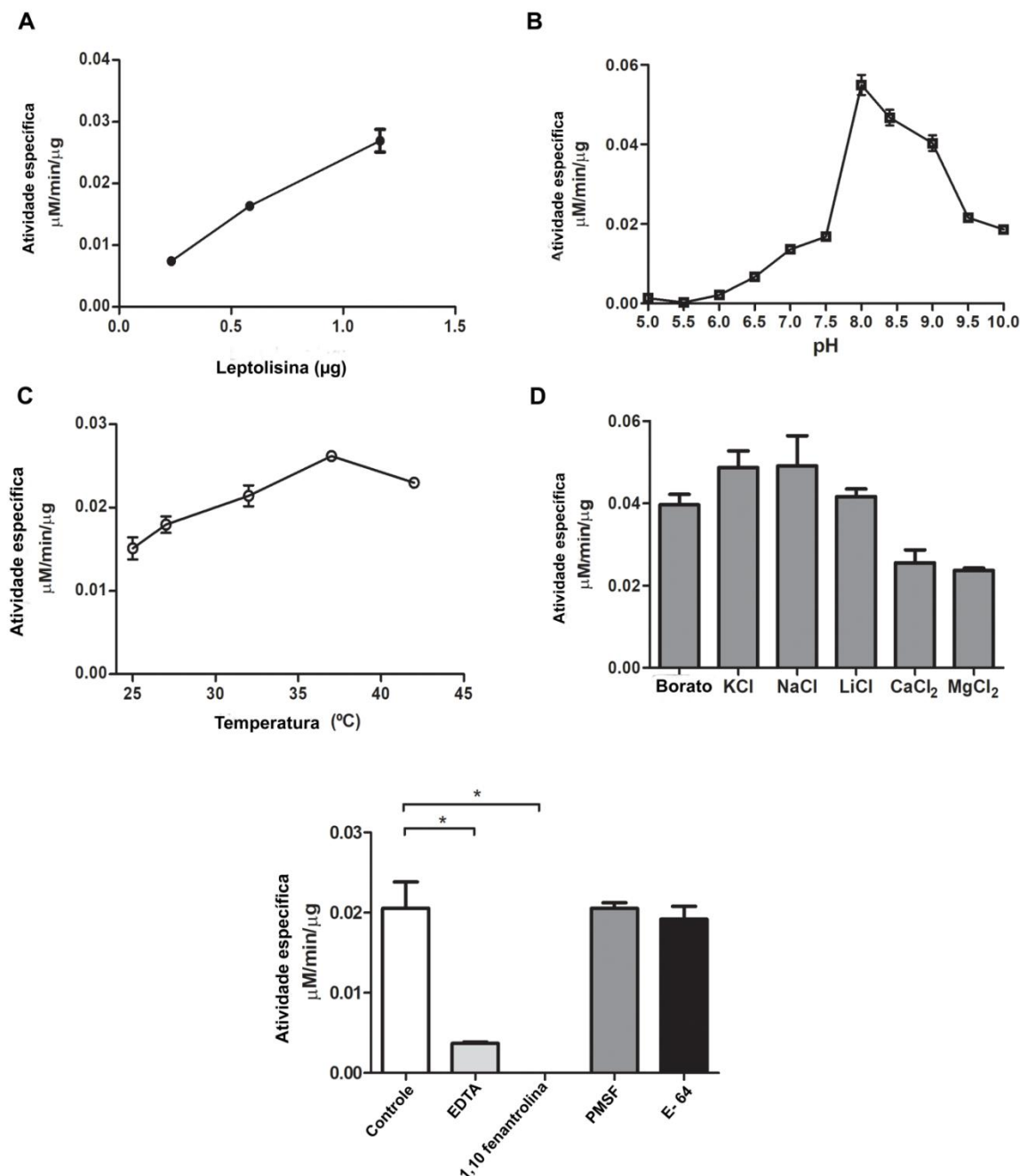
##### 4.4.1. Caracterização bioquímica: efeito do pH, concentração de sal, temperatura e inibidores

O sistema FRET é um processo físico pelo qual a energia é transferida de um fluoróforo molecular excitado (doador) a outro fluoróforo (aceptor) por meio de acoplamento dipolo-dipolo de longo alcance intermolecular. O FRET pode ser uma medida precisa da proximidade molecular em distância angstrom (10-100Å) e altamente eficiente se o doador e o acceptor estiverem posicionados dentro do raio de Förster (a distância a qual a metade da energia de excitação do doador é transferida para o acceptor, geralmente de 3 a 6 nm). A eficiência da técnica depende da sexta potência inversa da energia intermolecular de separação (FÖRSTER, 1965; LAKOWICZ, 1999).

A atividade enzimática da leptolisina foi inicialmente avaliada usando peptídeos FRET sintéticos. Um dos substratos utilizados, Abz-GLARSNL-EDDnp, foi eficientemente hidrolisado pela

leptolisina, sendo então selecionado para posterior caracterização bioquímica. Estudos cinéticos foram realizados para avaliar os efeitos do pH, temperatura e sais na atividade da protease. Conforme mostrado na Figura 12, quantidades crescentes de leptolisina intensificaram o sinal fluorescente de maneira dependente da dose (Figura 12A). A enzima exibiu atividade máxima em pH 8,0 (Figura 12B) e 37°C (Figura 12C), e a atividade hidrolítica foi observada na presença de diferentes sais, mas nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre eles (Figura 12D). A ação proteolítica da metaloprotease foi fortemente inibida por EDTA e 1,10-fenantrolina, mas não por E-64 ou PMSF (Figura 12E).

**Figura 12.** Caracterização bioquímica inicial da leptolisina de *L. interrogans* utilizando o peptídeo Abz-GLARSNL-EDDnp (5  $\mu$ M) como substrato



(A) Curva dose-resposta utilizando três diferentes quantidades de leptolisina (0,3  $\mu$ g, 0,6  $\mu$ g e 1,2  $\mu$ g); (B) Avaliação do pH ótimo (pH 5 a pH 10); (C) Estudo de termoestabilidade entre 25 $^{\circ}$ C e 42 $^{\circ}$ C; (D) Influência de cátions monovalentes e bivalentes na atividade da leptolisina; (E) Efeito de inibidores na atividade catalítica da leptolisina. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. Os resultados sobre a influência de sais (D) e inibidores (E) na atividade proteolítica da leptolisina foram analisados usando análise de variância (ANOVA) de uma via para comparações entre grupos seguido de um teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas (\*  $p < 0,05$ ).

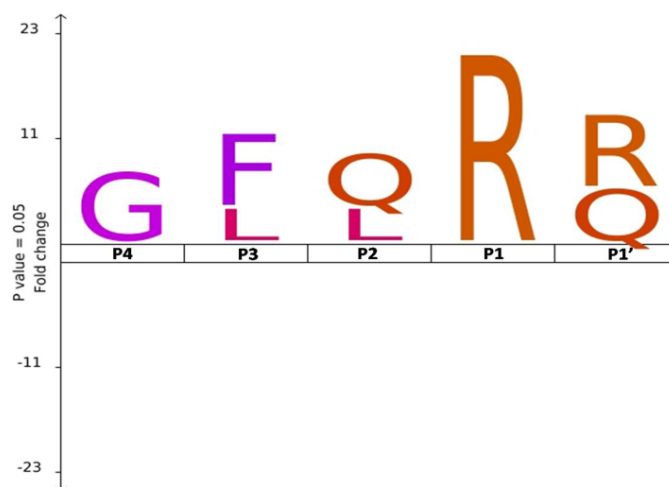
#### 4.4.2. Análise dos sítios de clivagem e das atividades específicas

O ponto de clivagem produzido pela leptolisina de *L. interrogans* no substrato fluorescente Abz-GLARSNL-EDDnp foi determinado. A protease produziu um único ponto de clivagem: Arg-Ser. A ação da leptolisina sobre os substratos Abz-GGFLRR-EDDnp, Abz-FLRRV-EDDnp, Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp e Abz-GLQRALEI-EDDnp também foi avaliada (Tabela 5), o que permitiu uma análise preliminar de sua especificidade primária. O Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp foi o substrato mais suscetível à leptolisina, apresentando atividade específica de 0,45  $\mu\text{M}/\mu\text{g}/\text{min}$ , seguido de Abz-FLRRV-EDDnp (0,3  $\mu\text{M}/\mu\text{g}/\text{min}$ ) e de Abz-GLASRRV-EDDnp (0,19  $\mu\text{M}/\mu\text{g}/\text{min}$ ). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5 e os dados obtidos pelo software *IceLogo* (Figura 13), a preferência pela arginina na posição P1 foi significativa para a leptolisina, pois todos os substratos testados foram clivados após esse resíduo específico. Apesar desta acentuada preferência nesta posição, diferenças quanto às atividades específicas para a hidrólise de Abz-GGFLRRV-EDDnp (0,09  $\mu\text{M}/\mu\text{g}/\text{min}$ ) e Abz-FLRRV-EDDnp (0,3  $\mu\text{M}/\mu\text{g}/\text{min}$ ) indicam que a leptolisina tem um sítio de ligação estendido para sua associação aos substratos, uma vez que a adição de dois resíduos de glicina na região N-terminal do substrato reduziu a atividade específica em mais de três vezes. No entanto, mais estudos usando um número maior de substratos serão necessários para confirmar esta questão.

**Table 5.** Atividades específicas e pontos de clivagem produzidos pela leptolisina de *L. interrogans* nos substratos FRET

Atividade específica ( $\mu\text{M}/\mu\text{g}/\text{min}$ )		Substrato									
		P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	
0,19 $\pm$ 0,01	Abz	-	G	L	A	R	S	N	L	-	EDDnp
0,02 $\pm$ 0,01	Abz	-	G	L	Q	R	A	L	E	I	EDDnp
0,30 $\pm$ 0,05	Abz	-	-	F	L	R	R	V	-	-	EDDnp
0,09 $\pm$ 0,01	Abz	G	G	F	L	R	R	-	-	-	EDDnp
0,45 $\pm$ 0,01	Abz	RP PG	F	S	P	F	R	Q	-	-	EDDnp

**Figura 13.** Estudo preliminar das especificidades primárias da leptolisina



Pontos de clivagem nos substratos FRET mencionados na Tabela 5 obtidos com o programa *IceLogo* (COLAERT et al., 2009).

#### 4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA LEPTOLISINA SOBRE MOLÉCULAS DA MATRIZ EXTRACELULAR *IN VITRO* E *IN VIVO*

##### 4.5.1. Degradação de proteoglicanas e de fibronectina

Proteoglicanas, proteínas altamente glicosiladas, são componentes majoritários da matriz extracelular. Elas preenchem espaços na matriz estabelecendo pontes entre diversas macromoléculas. São elas que conferem um microambiente altamente hidratado e gelatinoso, característico da matriz extracelular encontrada em certos tecidos (CHAGNOT et al., 2012). A matriz extracelular fornece suporte estrutural para as células e está envolvida na sinalização célula-célula, além de participar na regulação da proliferação, diferenciação e migração celulares (LOCKHART et al., 2011).

As proteoglicanas possuem um *core* proteico e açúcares associados, e estão presentes no corpo todo, principalmente na córnea, pele, tendões e cartilagem, mas também são encontradas no fígado, rins, cérebro, pulmões e vasculatura em geral, dentro da camada adventícia (SVENSSON, 2001).

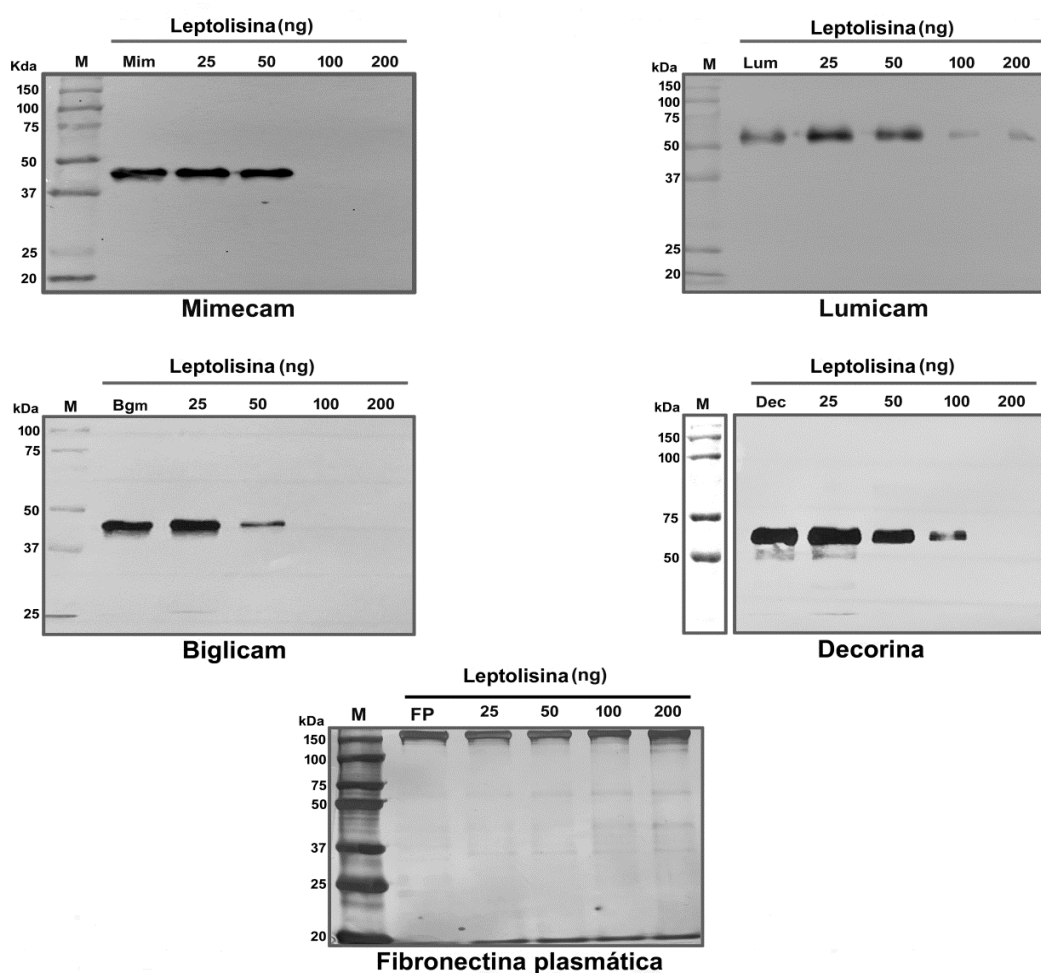
A degradação de algumas proteoglicanas da classe conhecida como *small leucine-rich proteoglycans* (SLRP) por proteases presentes nos sobrenadantes de cultura de leptospiros foi



avaliada neste estudo, uma vez que já se demonstrou que tais componentes são alvos de proteases de *L. interrogans* liberadas no meio extracelular (da SILVA et al., 2018).

Inicialmente, para avaliar a quantidade mínima de leptolisina necessária para a hidrólise de SLRP, foi realizado um ensaio com quantidades crescentes da protease (0,025 – 0,2  $\mu\text{g}$ ). Para a maioria dos substratos, uma hidrólise eficiente foi observada com 0,1  $\mu\text{g}$  de leptolisina (Figura 14).

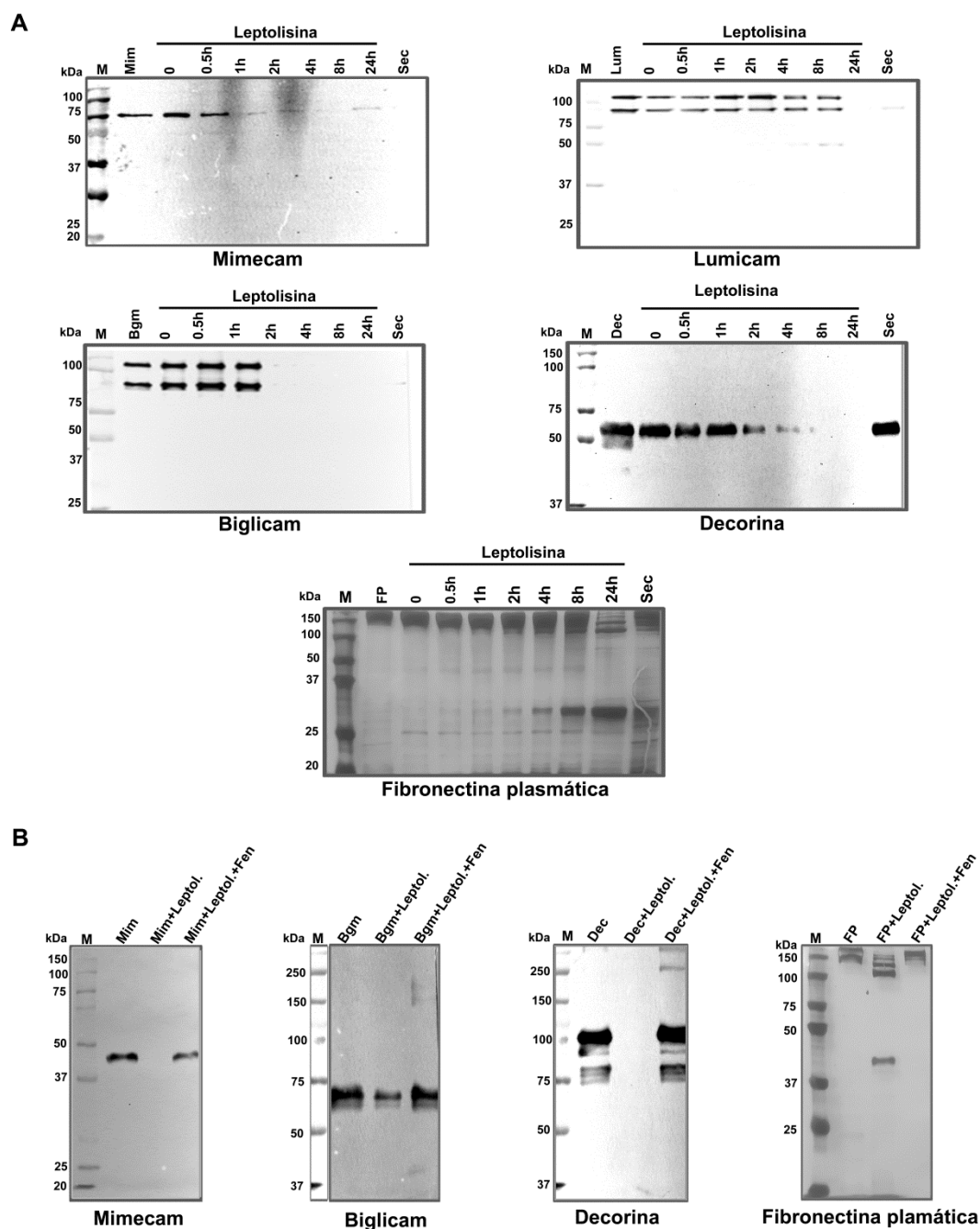
**Figure 14.** Degradação dose-dependente de proteoglicanas e fibronectina plasmática pela leptolisina de *L. interrogans*



Mimecam, lumicam, biglicam, decorina (0,5  $\mu\text{g}$ ) e fibronectina plasmática (5  $\mu\text{g}$ ) foram incubadas com leptolisina (25 – 200 ng) a 37°C por 24 h. Os produtos de clivagem foram submetidos a SDS-PAGE sob condições redutoras, transferidos para membranas de nitrocelulose e detectados com anticorpos específicos, ou o gel foi corado com prata (FP), conforme descrito em Materiais e Métodos. Mim (mimecam), Lum (lumicam), Bgm (biglicam), Dec (decorina), FP (fibronectina plasmática).

Mimecam, também conhecida como osteoglicina, e biglicam foram completamente hidrolisadas pela protease após 4h de incubação. A decorina também foi eficientemente degradada, mas a degradação do lumicam exigiu 24h de incubação. Proteólise limitada de fibronectina também foi observada (Figura 15A). Em todos os ensaios, o sobrenadante *L. interrogans* sorovar Kennewicki cepa Fromm (LPF) foi incluído como controle positivo. O quelante de metal 1,10-fenantrolina aboliu parcial ou totalmente a atividade proteolítica da leptolisina sobre os substratos (Figura 15B). Nossos dados sugerem que a leptolisina pode, de fato, ser uma das metaloproteases secretadas por *L. interrogans* capazes de degradar componentes da matriz extracelular.

**Figura 15.** Degradação tempo-dependente de proteoglicanas e fibronectina plasmática pela leptolisina de *L. interrogans*

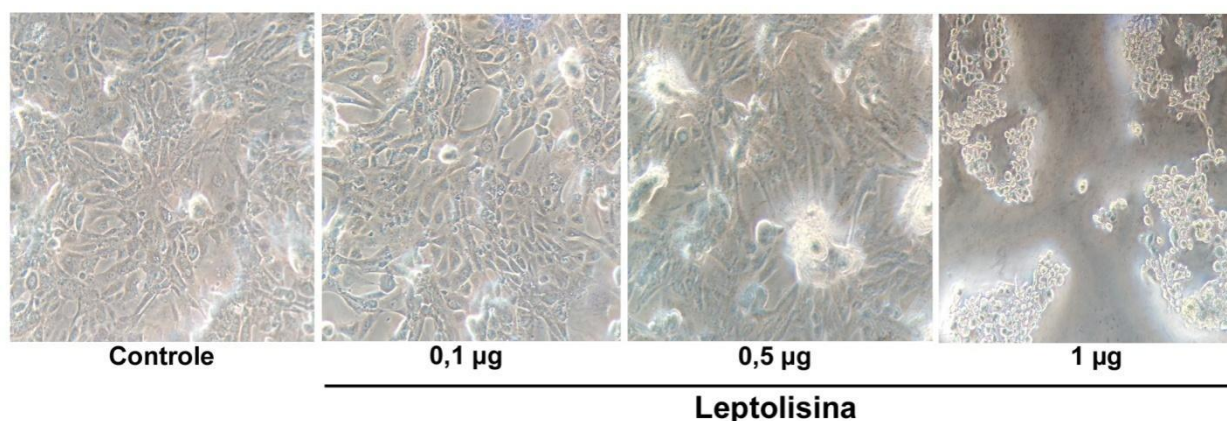


(A) Mimecam, lumicam, biglicam, decorina (0,5  $\mu\text{g}$ ) e fibronectina plasmática (5  $\mu\text{g}$ ) foram incubadas com leptolisina (0,1  $\mu\text{g}$ ) a 37°C pelos períodos de tempo indicados. Os produtos da clivagem foram submetidos a SDS-PAGE sob condições redutoras, transferidos para membranas de nitrocelulose e detectados com anticorpos específicos, ou o gel foi corado com prata (FP). (B) Inibição da atividade proteolítica: antes da adição de cada substrato, a leptolisina (0,1  $\mu\text{g}$ ) foi incubada com 5 mmol/L de 1,10-fenantrolina (pista 4) por 30 min em temperatura ambiente. Os substratos foram adicionados e as incubações prosseguiram por 24 h. Os produtos de clivagem foram analisados como descrito acima. Mim (mimecam), Lum (lumicam), Bgm (biglicam), Dec (decorina), FP (fibronectina plasmática), Sec (secretado de *Leptospira*), Leptol. (leptolisina), Fen (1,10-fenantrolina).

#### 4.5.2. Alterações morfológicas nas células HK-2 induzidas pela leptolisina de *L. interrogans*

Os efeitos da leptolisina sobre células HK-2, uma linhagem de células epiteliais oriunda dos túbulos proximais de rim humano adulto normal, foram também avaliados. Claramente, observa-se um efeito dependente da dose da protease sobre as HK-2. O descolamento de células aderentes e as alterações morfológicas são bastante visíveis, conforme ilustrado na Figura 16.

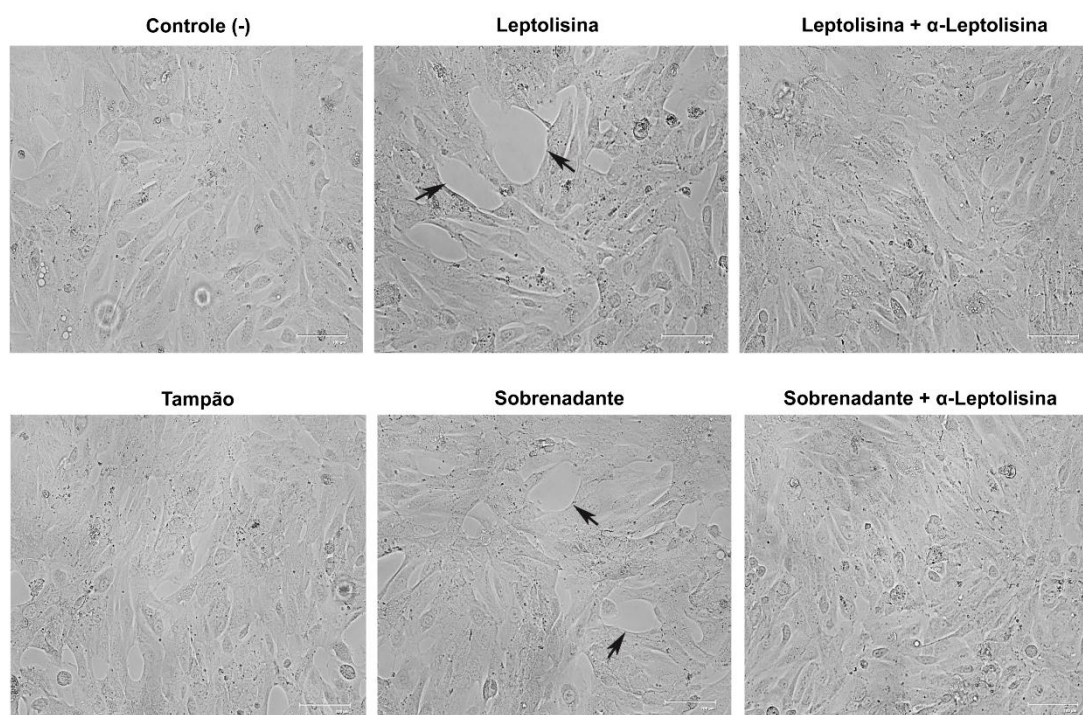
**Figura 16.** Alterações morfológicas induzidas pela leptolisina de *L. interrogans* em células renais



Células HK-2 foram incubadas com 0,1 µg, 0,5 µg ou 1 µg de leptolisina recombinante por 24 h e analisadas em microscópio óptico. Como controle, as células foram incubadas com tampão. Aumento: 400 x.

As células também foram incubadas com o sobrenadante de cultura de *L. interrogans* sorovar Manilae L495. Embora menos notável do que o fenótipo observado para as células tratadas com leptolisina purificada, o desprendimento parcial das células HK-2 foi observado após incubação com o sobrenadante, e pode ser evidenciado por regiões vazias apontadas pelas setas pretas (Figura 17). O descolamento foi abolido quando a protease purificada ou o sobrenadante foram pré-incubados com antissoro contra leptolisina (Figura 17).

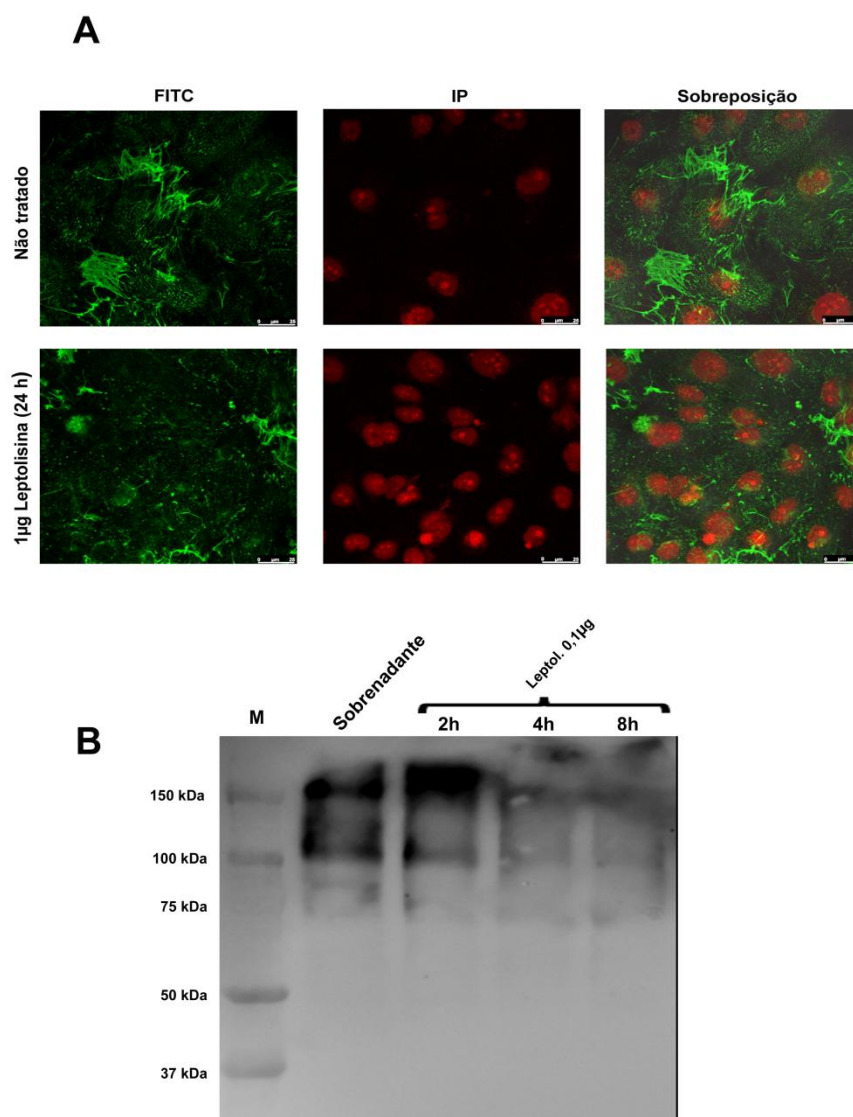
**Figura 17.** Alterações morfológicas induzidas em células renais pela leptolisina purificada e por proteases presentes no sobrenadante de cultura de *L. interrogans*



Células HK-2 foram incubadas por 24 h com leptolisina (0,5 µg) ou sobrenadante de *Manilae* L495 (5 µg) pré-incubados (ou não) com anti-leptolisina (1: 100). Controles negativos incluíram células com meio de cultura (controle -) e células com tampão da leptolisina (tampão). As células foram visualizadas em microscópio óptico.

Distúrbios na matriz extracelular que circunda as células HK-2 e em moléculas de adesão célula-célula foram avaliados por imunofluorescência. Nas células tratadas com leptolisina, o padrão típico de rede fibrilar da fibronectina (observado nas células não tratadas) é menos evidente, assumindo uma morfologia mais pontilhada (Figura 18A). Esses dados indicam degradação desta macromolécula, confirmando o que foi observado por Western blot com o sobrenadante das células HK-2 nos tempos de 4 e 8 h (Figura 18B) e também com a fibronectina purificada (Figura 15).

**Figura 18.** Efeito da leptolisina de *L. interrogans* sobre a fibronectina secretada pelas células HK-2



(A) Células em cultura foram incubadas com 1 µg de leptolisina recombinante por 24 h e analisadas por imunofluorescência: fibronectina marcada em verde e os núcleos das células em vermelho. Barras representam 25 µm. (B) Células HK-2 em cultura foram incubadas com 0,1 µg de leptolisina recombinante pelos tempos indicados e os sobrenadantes foram analisados com anti-fibronectina por Western blot. M: Marcador Kaleidoscope (Invitrogen).

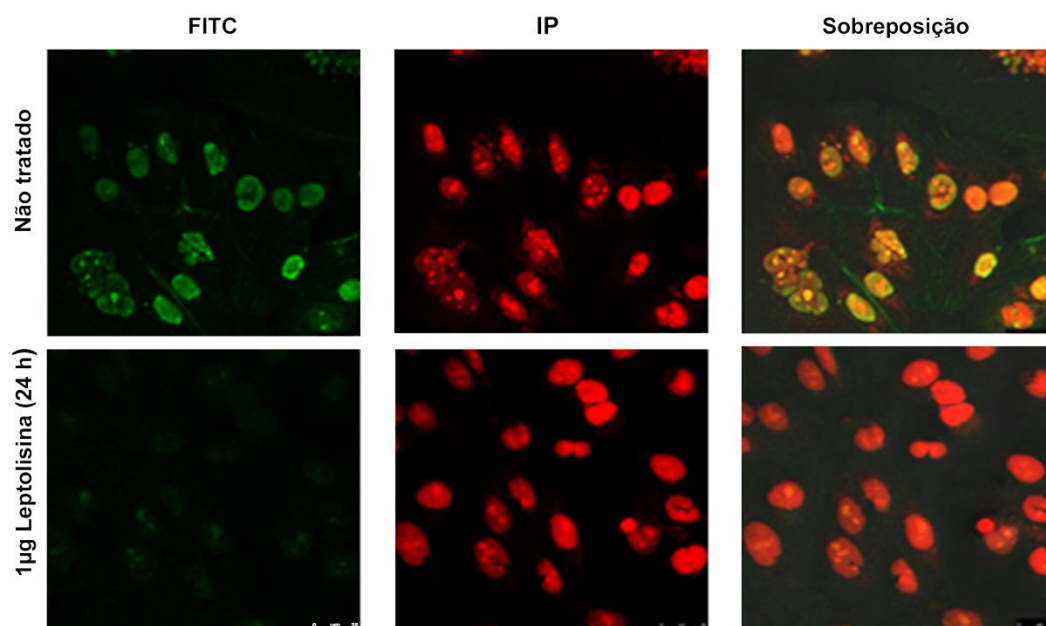
Em células epiteliais existem diferentes moléculas responsáveis pela adesão célula-célula. *Tight junctions*, *gap junctions* e *adherens junctions* são estruturas adesivas que regulam a passagem de constituintes do sangue e células circulantes para o tecido subjacente. Condições patológicas de permeabilidade celular levam a graves disfunções, muitas vezes observadas nas infecções por

*Leptospira*. No que diz respeito às moléculas de adesão foram avaliados dois componentes das *tight junctions*: zônula ocludens (ZO-1) e ocludina. Estas junções estão normalmente situadas no lado apical das junções célula-célula (LEMICHEZ et al., 2010). Ocludina é uma proteína transmembrana diretamente envolvida na adesão juncional (DEJANA, et al., 2009). ZO-1 é uma proteína da membrana periférica localizada no lado citoplasmático da membrana plasmática. Após o tratamento com 1 µg de leptolisina por 24 h, pudemos observar uma diminuição no sinal de ocludina, comparado ao controle, sugerindo uma possível degradação desta molécula pela protease. Com relação à ZO-1, pudemos observar tanto uma diminuição do sinal quanto uma localização atípica da molécula, que deixa de “contornar as células” de forma regular (Figura 19). Esse padrão já havia sido relatado anteriormente em células endoteliais infectadas com leptospiros (SATO e COBURN, 2017).

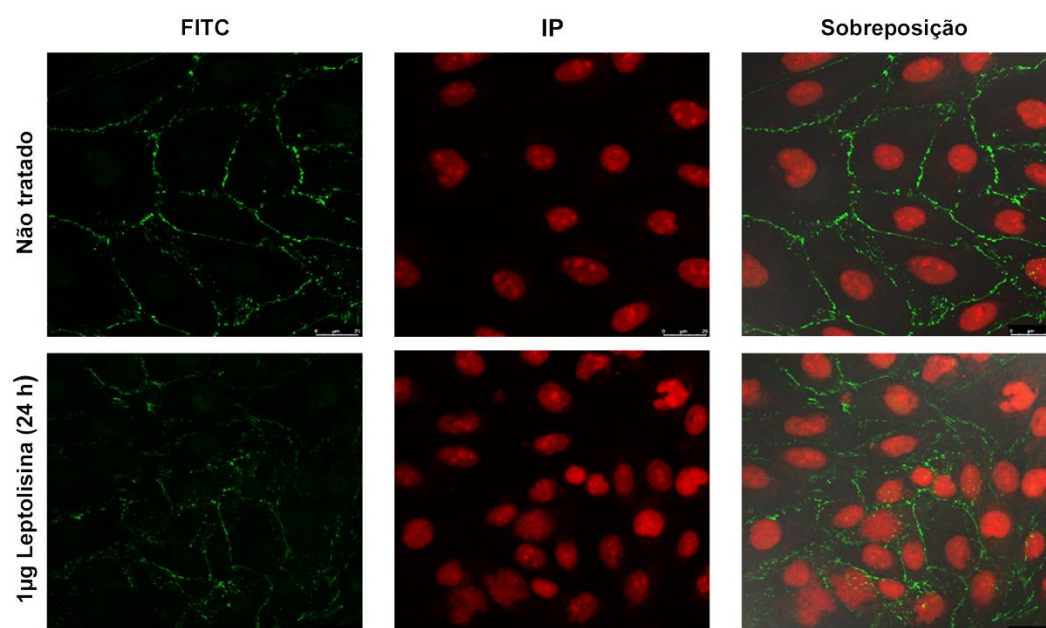


**Figura 19.** Efeito da leptolisina sobre proteínas das *tight junctions* de células epiteliais renais humanas HK-2

**A. Ocludina**



**B. Zonula Ocludens-1 (ZO-1)**



Células em cultura foram incubadas com 1 µg de leptolisina recombinante por 24 h e analisadas por imunofluorescência. **(A)** Ocludina e **(B)** Zônula ocludens (ZO-1) são mostradas em verde. Os núcleos são marcados em vermelho em todos os painéis

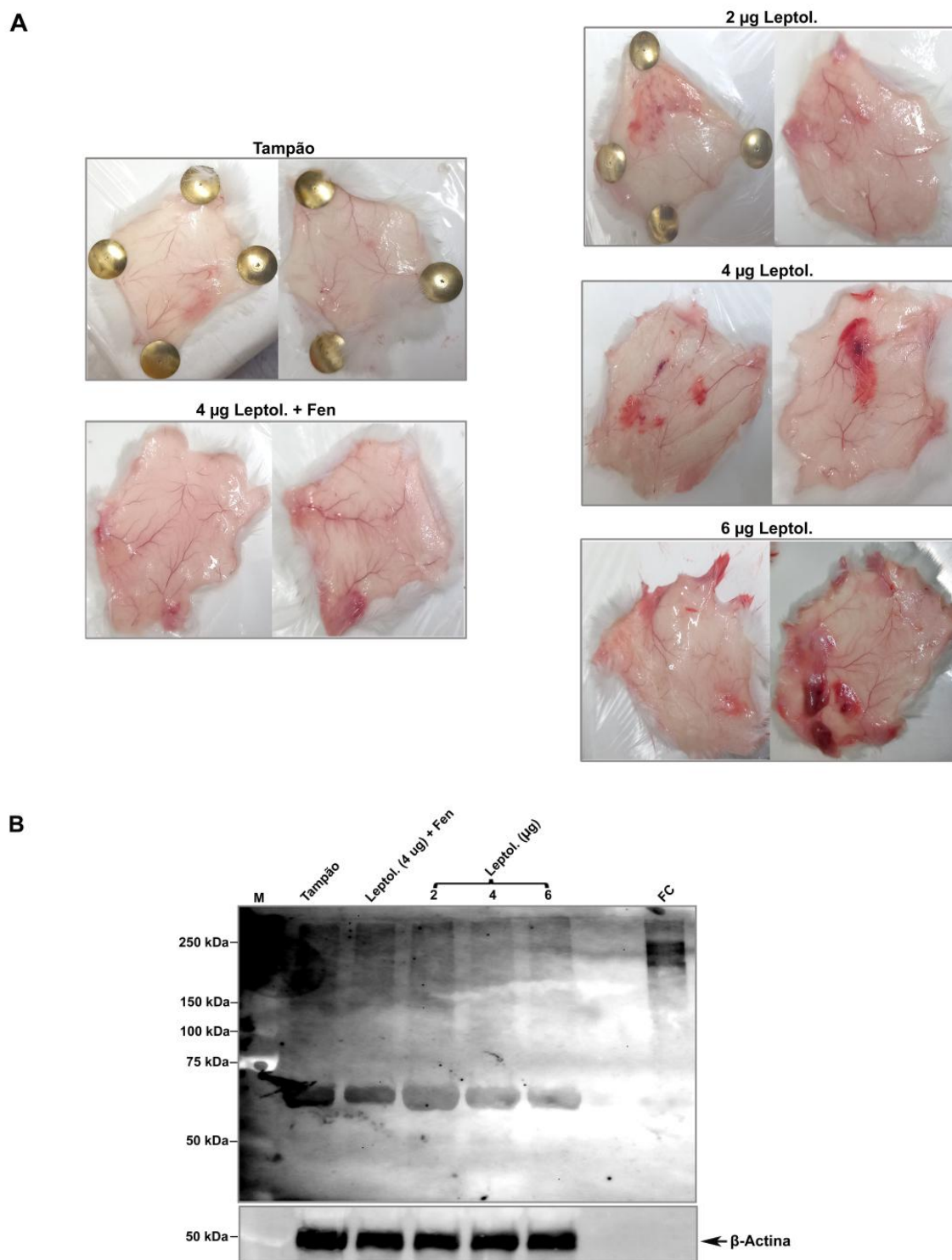


#### 4.5.3. Efeito proteolítico da leptolisina de *L. interrogans in vivo*

Para avaliar os efeitos da leptolisina sobre a matriz extracelular *in vivo*, a protease foi inoculada na pele dorsal de camundongos por via intradérmica. Após 4 h, os animais foram sacrificados e os fragmentos de pele ao redor dos locais de inoculação foram removidos, homogeneizados, e as proteínas da pele foram analisadas por Western blot com anticorpos para fibronectina, um abundante componente da matriz. Curiosamente, focos hemorrágicos foram observados na pele dorsal de animais inoculados com 2 – 6 µg de leptolisina recombinante, mas não nas peles controle removidas de camundongos inoculados com tampão ou leptolisina (4 µg) pré-incubada com 1,10 – fenantrolina (Figura 20A). A hidrólise de componentes da matriz extracelular e da membrana basal por certas metaloproteases está associada a hemorragias e pode resultar da ação direta dessas enzimas ou de proteinases teciduais ativadas no contexto inflamatório e hemorrágico local (ASEGA et al., 2020).

A fibronectina isolada da pele de camundongos migrou ligeiramente diferente da fibronectina celular humana (FC), adicionada como controle, com uma banda adicional de aproximadamente 70 kDa, que pode corresponder ao fragmento de fibronectina N-terminal que abriga domínios de interação com colágeno/gelatina e heparina (DALTON e LEMMON, 2021). A intensidade global das bandas proteicas correspondentes à fibronectina diminuiu nas peles hemorrágicas, notadamente em animais inoculados com 4 ou 6 µg de leptolisina recombinante (Figura 20B, pistas 4 e 5). Assim, a degradação ou ruptura da integridade da matriz por ação direta ou indireta da leptolisina pode levar à desestabilização da microvasculatura e promover hemorragia.

**Figura 20.** Degradação de fibronectina isolada da pele de camundongos inoculados com leptolisina de *L. interrogans*



(A) Peles controle (animais inoculados com tampão ou com 4 µg de leptolisina + 1,10 fenantrolina) e peles inoculadas com 2 - 6 µg de leptolisina são mostradas. (B) Amostras de proteína (4 µg) isoladas de peles de camundongos foram analisadas por Western blot com anti-fibronectina ou anti-β actina conforme descrito em Materiais e Métodos.

## 4.6. AÇÃO DA LEPTOLISINA DE *L. INTERROGANS* SOBRE O SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO

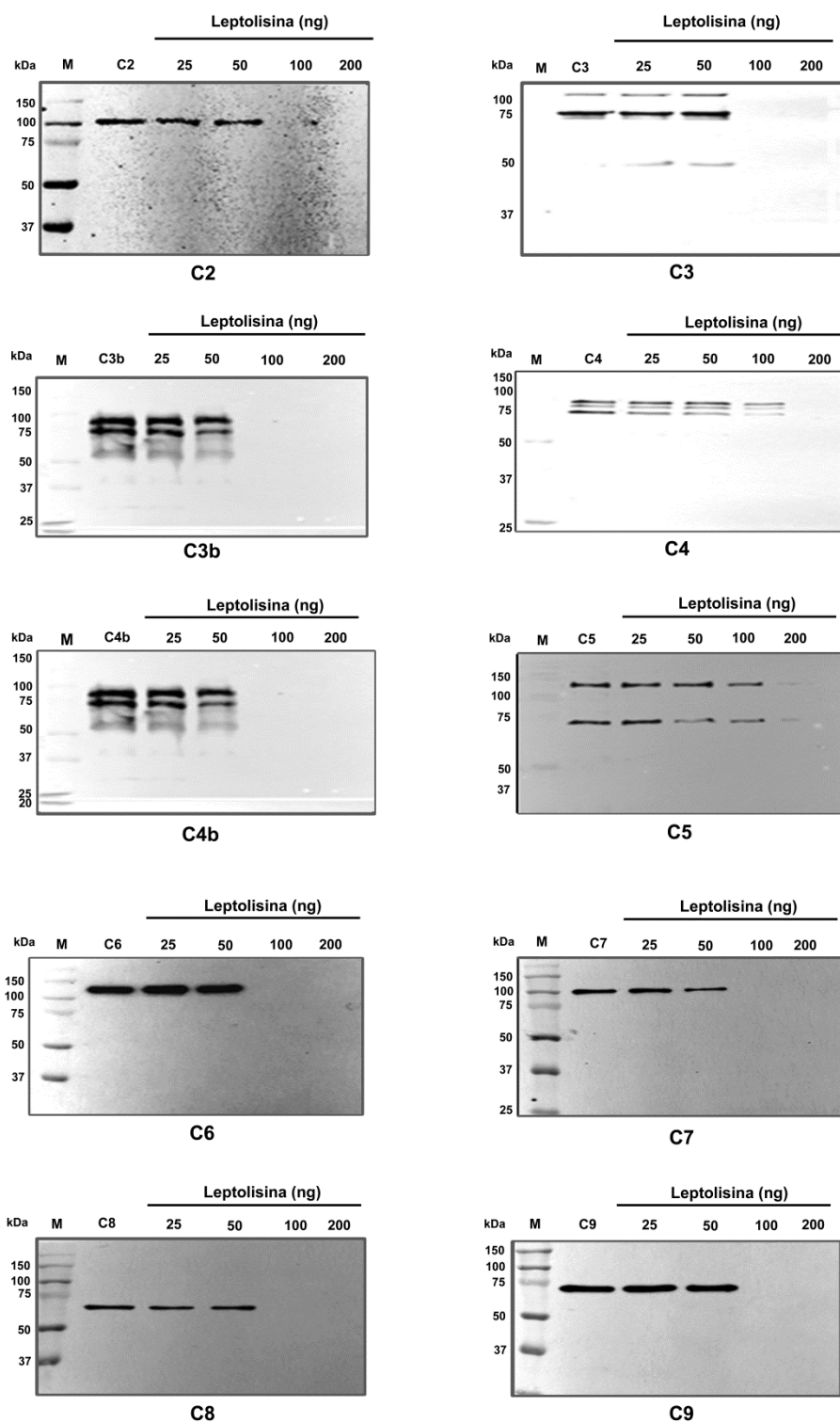
### 4.6.1. Degradação de proteínas do sistema complemento

O sistema complemento humano é a primeira linha de defesa da imunidade inata. É composto por cerca de 50 proteínas que atuam em cascata e pode ser ativado por 3 vias: clássica, alternativa e das lectinas. As 3 vias culminam na formação do complexo de ataque à membrana (MAC) onde são formados poros na membrana do patógeno causando lise osmótica celular. Além disso, o sistema complemento participa da remoção de imunocomplexos e células apoptóticas, e estimula o processo inflamatório, uma vez que há geração de anafilatoxinas e opsoninas em decorrência de sua ativação.

As proteínas do sistema complemento avaliadas nos nossos ensaios foram C2, C3, C3b, C4, C4b, C5, C6, C7, C8 e C9. Conforme previamente demonstrado por nosso grupo, proteases secretadas por leptospiros patogênicos possuem a capacidade de degradar proteínas do sistema complemento humano (FRAGA et al., 2014). As proteases clivam as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  de C3 e trabalham em sinergia com reguladores hospedeiros que inativam C3b.

Inicialmente, para avaliar a quantidade mínima de leptolisina necessária para a hidrólise de proteínas do complemento, foi realizado um ensaio com quantidades crescentes da protease (0,025 – 0,2  $\mu$ g). Para a maioria dos substratos, uma hidrólise eficiente foi observada com 0,1  $\mu$ g de leptolisina (Figura 21), fato já observado com proteínas da matriz extracelular.

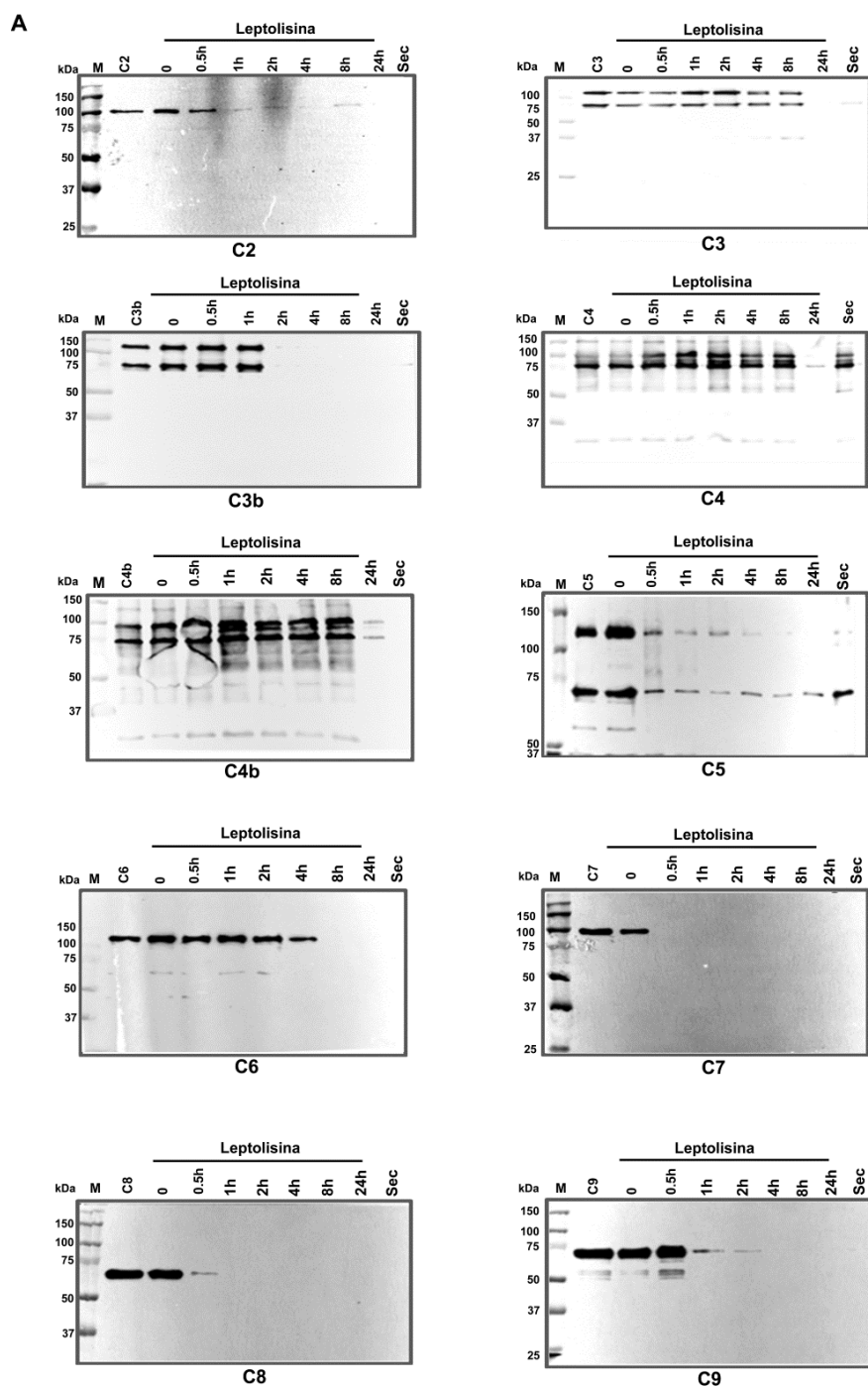
**Figura 21.** Degradação dose-dependente de moléculas do sistema complemento pela leptolisina



C2, C3, C3b, C4, C4b, C5, C6, C7, C8 e C9 foram incubados com 25, 50, 100 ou 200 ng de leptolisina recombinante por 24 h e os produtos de degradação foram analisados com anticorpos específicos por Western blot.

Houve variação nos tempos necessários para a geração de produtos de degradação. C2, C3b, C4b, C5, C7, C8 e C9, foram mais sensíveis à proteólise quando comparadas às outras moléculas. Cabe salientar a rápida clivagem de C3b e C4b em comparação a C3 e C4. No início da ativação das 3 vias, são gerados C3b e C4b a partir de C3 e C4 respectivamente. É bem possível que tais moléculas (C3 e C4), ao perderem os fragmentos C3a e C4a gerando C3b e C4b, exponham sítios mais sujeitos à proteólise pela leptolisina, o que explicaria os resultados observados (Figura 22).

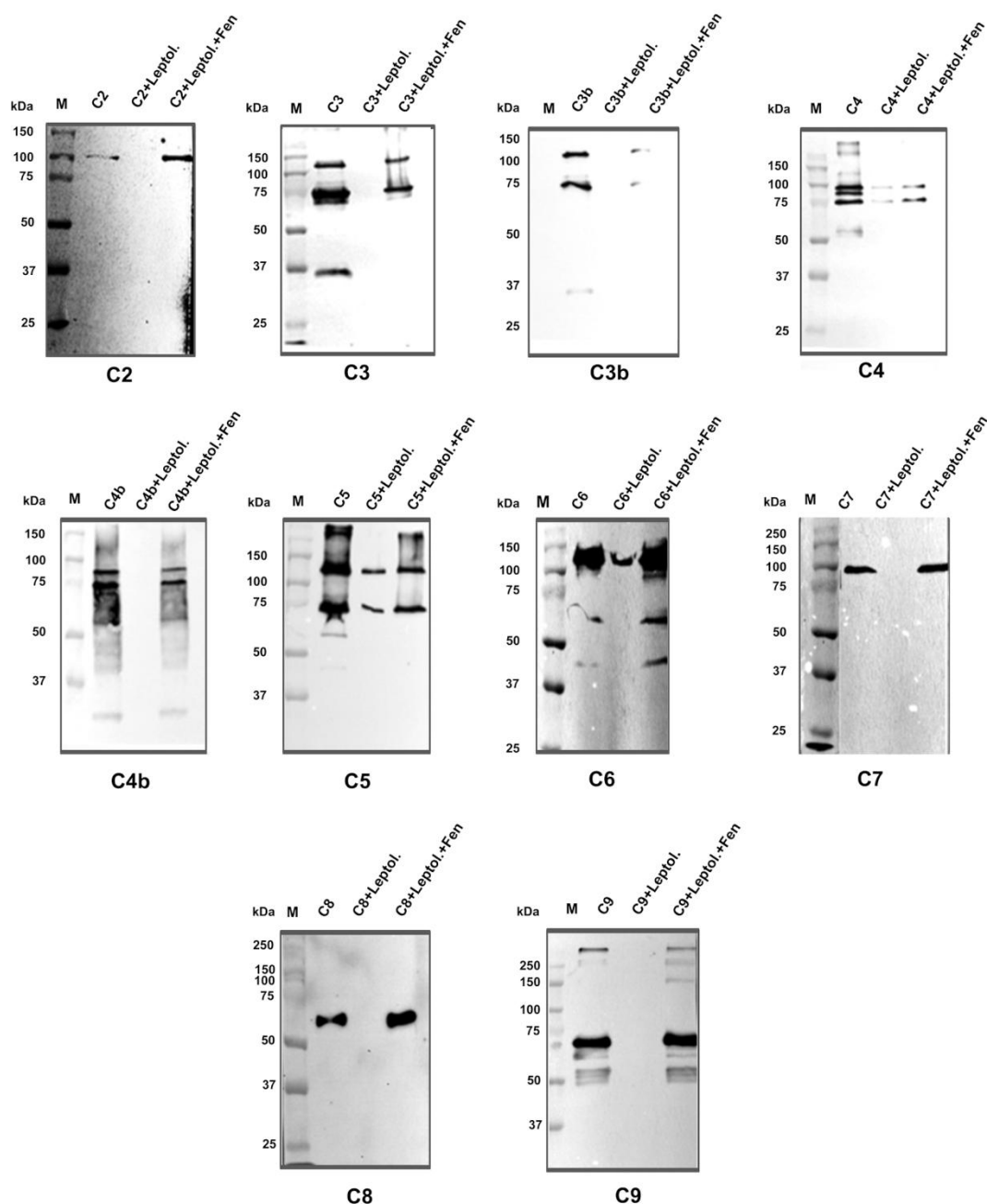
**Figura 22.** Degradação tempo-dependente de moléculas do sistema complemento pela leptolisina



C2, C3, C3b, C4, C4b, C5, C6, C7, C8 e C9 foram incubados com 100 ng de leptolisina recombinante pelos tempos indicados e os produtos de degradação foram analisados com anticorpos específicos por Western blot. Como controles, os substratos foram incubados apenas com PBS pelo período máximo (24 h), assim como os controles positivos, produtos de incubação do sobrenadante da estirpe virulenta LPF com os substratos purificados (Sec). M: Marcador Kaleidoscope (Invitrogen).

A degradação de todos os substratos foi inibida por 1,10 fenantrolina (Figura 23).

**Figura 23.** Inibição da atividade proteolítica de moléculas do sistema complemento pela leptolisina

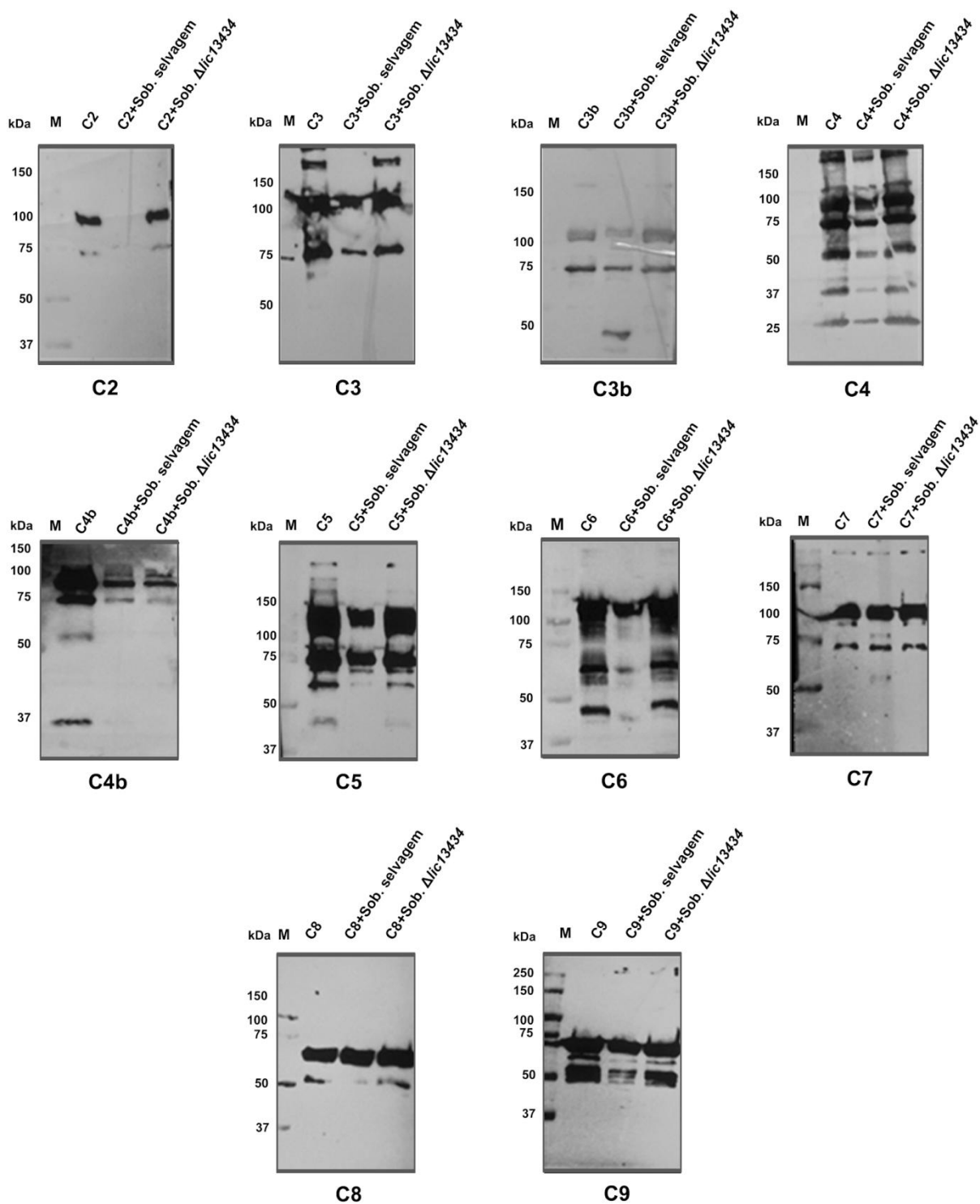


C2, C3, C3b, C4, C4b, C5, C6, C7, C8 e C9 foram incubados com 100 ng de leptolisina recombinante com ou sem 1,10 fenantrolina e os produtos de degradação foram analisados com anticorpos específicos por *Western blot*. Como controle, os substratos foram incubados apenas com PBS. M: Marcador Kaleidoscope (Invitrogen).

Além de analisar a ação proteolítica da leptolisina recombinante purificada, produzimos uma cepa nocaute para leptolisina ( $\Delta lic13434$ , caracterizada adiante) e utilizamos o sobrenadante de cultura desta cepa nos ensaios que se seguem. As proteínas purificadas do sistema complemento foram incubadas com o secretado (proteínas liberadas para o meio extracelular) de *L. interrogans* Manilae L495 (selvagem e  $\Delta lic13434$ ). A maioria dos substratos foi parcialmente degradada pelo secretado da cepa selvagem. No entanto, à exceção de C4b, os demais componentes do sistema complemento permaneceram íntegros após incubação com o secretado obtido a partir da cepa nocaute (Figura 24). Esses dados indicam que a leptolisina secretada para o meio extracelular contribui para a degradação de moléculas que fazem parte das 3 vias de ativação do sistema complemento.



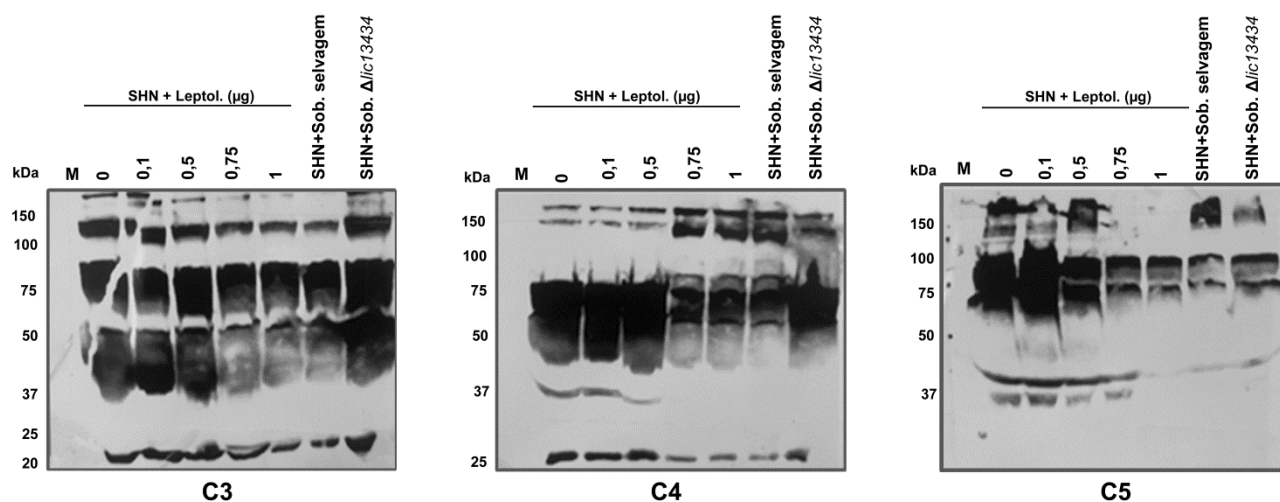
**Figura 24.** Degradação de moléculas do sistema complemento por proteases do sobrenadante de *L. interrogans* Manilae L495 (selvagem e  $\Delta lic13434$ )



C2, C3, C3b, C4, C4b, C5, C6, C7, C8 e C9 (1  $\mu$ g) foram incubados com 5  $\mu$ g de proteínas do sobrenadante por 24 h e os produtos de degradação foram analisados com anticorpos específicos por Western blot. Como controles, os substratos foram incubados apenas com PBS. M: Marcador Kaleidoscope (Invitrogen).

Por fim, avaliou-se a degradação de C3, C4 e C5 presentes no soro humano pela leptolisina e pelas proteases secretadas pelas cepas selvagem e nocaute para leptolisina. Degradação parcial das 3 moléculas foi observada nas incubações com 0,75 e 1  $\mu\text{g}$  de leptolisina purificada, assim como na presença do secretado da cepa nocaute. No caso de C5, o secretado da cepa selvagem também degradou parcialmente a molécula, indicando que deve haver outras proteases com ação sobre esta proteína do complemento (Figura 25).

**Figura 25.** Degradação de C3, C4 e C5 séricos pela leptolisina purificada e por proteases do sobrenadante de *L. interrogans* Manilae L495 (selvagem e  $\Delta lic13434$ )



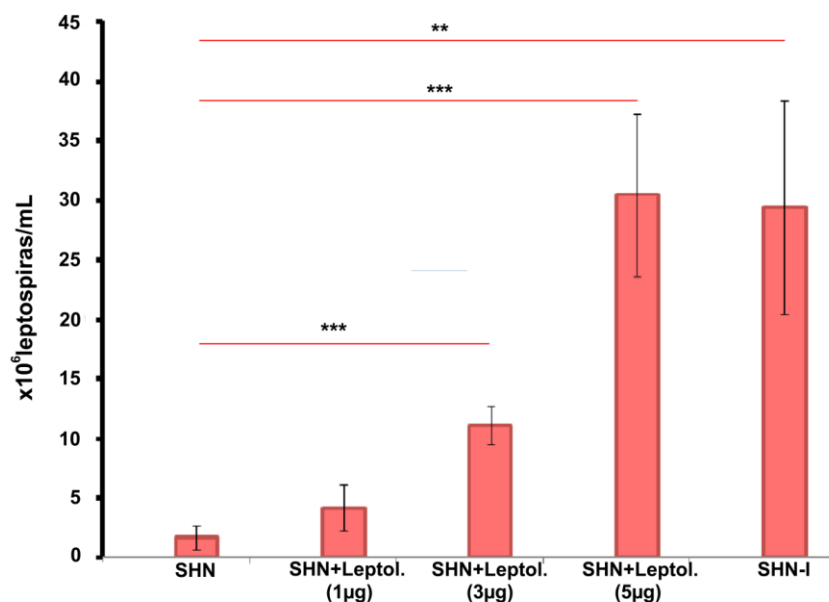
SHN foi incubado com leptolisina purificada nas quantidades indicadas ou com 5  $\mu\text{g}$  de proteínas do sobrenadante por 24 h. Os produtos de degradação foram analisados com anticorpos específicos por Western blot. Como controle, o soro humano normal (SHN) foi incubado apenas com PBS. M: Marcador Kaleidoscope (Invitrogen).

#### 4.6.2. Sobrevivência de leptospiras em soro humano tratado com leptolisina

Estudos anteriores demonstraram que espécies saprófitas de *Leptospira* não sobrevivem à exposição ao soro humano. Isto se deve à ação do sistema complemento, que possui atividade lítica sobre tais espécies (MERI et al., 2005; BARBOSA et al., 2009). Conforme demonstrado, a leptolisina

é capaz de degradar as proteínas do sistema complemento. Portanto, realizamos um ensaio em que tratamos o soro humano com doses crescentes de leptolisina e, em seguida, avaliamos a sobrevivência da estirpe saprófita, *L. biflexa* sorovar Patoc I, no soro tratado com a protease. Os resultados mostram que ao tratar o soro humano com a leptolisina recombinante, este se torna incapaz de lisar as leptospiras saprófitas. A taxa de sobrevivência foi diretamente proporcional à quantidade de leptolisina utilizada nas incubações com o soro (Figura 26). Como controle positivo utilizou-se soro humano normal (SHN), e como controle negativo soro humano inativado a 56°C por 30 min (SHN-I). Como esperado, na presença de soro ativo, praticamente todas as bactérias morreram ao passo que na presença de soro inativado pelo calor, a maioria sobreviveu. Importante notar que na dose máxima de leptolisina (5 µg), a sobrevivência foi similar àquela observada na presença de soro inativado (Figura 26).

**Figura 26.** Sobrevivência de *L. biflexa* Patoc I em soro humano tratado com leptolisina

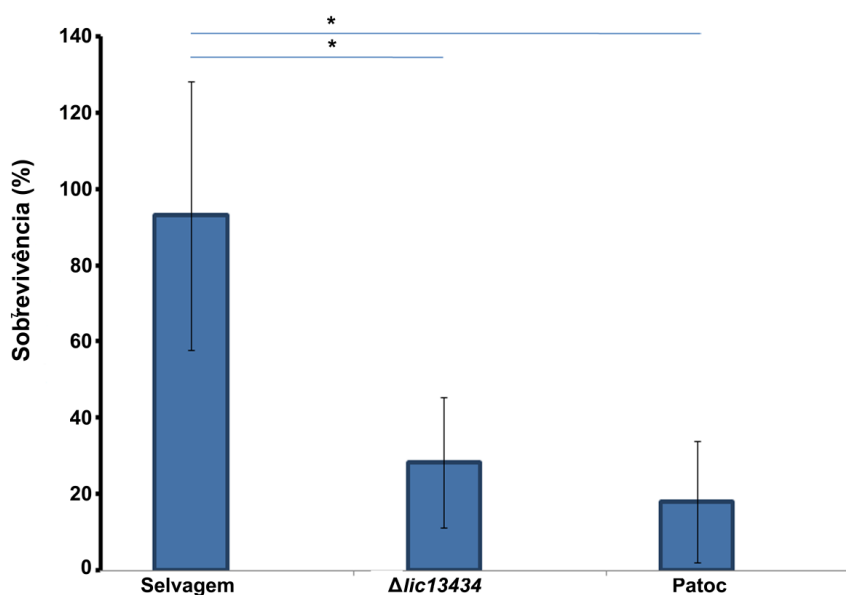


Soro humano normal (40 %) foi incubado com leptolisina nas quantidades indicadas durante 2 h. *Leptospira biflexa* Patoc ( $5 \times 10^7$ ) foram adicionadas aos soros e incubou-se novamente por 2 h. O número de bactérias viáveis foi estimado por microscopia de campo escuro. SHN: Soro humano normal, SHN-I: Soro humano normal inativado. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  (teste *t* Student).

#### 4.6.3. Sobrevivência de leptospiros (selvagem e nocaute para leptolisina) em soro humano normal

*L. interrogans* Manilae L495 (selvagem e  $\Delta lic13434$ ) ( $5 \times 10^7$  leptospiros/mL) foram incubadas com SHNe SHN-I (40%) a 37°C por 2 h. Após a incubação, as bactérias foram contadas em microscópio de campo escuro, utilizando câmara de Petroff-Hausser. A cepa saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, que é suscetível à ação bactericida do soro, também foi incluída nas análises como um controle. Conforme mostrado na Figura 27, a cepa nocaute ( $\Delta lic13434$ ) apresentou grande susceptibilidade ao soro, apresentando sobrevivência de cerca de 30 %, próxima à taxa observada pela cepa saprófita Patoc I. Portanto, a leptolisina contribui para o escape à atividade bactericida do sistema complemento.

**Figura 27.** Ensaio de resistência ao soro humano



Leptospiros ( $5 \times 10^7$ ) (Manilae L495, Manilae L495  $\Delta lic13434$  e Patoc I) foram incubadas paralelamente com soro humano ativo (SHN 40 %) e soro humano inativado a 56° C por 30 min (SHN-I 40 %) durante 2 h. Após incubação, foi feita a contagem das bactérias sobreviventes, em microscópio de campo escuro em câmara de Petroff-Hausser. Os dados apresentam as taxas de sobrevivência relativas ao soro humano inativo (sobrevivência SHN / SHN-I), expressas em porcentagem. Os experimentos representam a média  $\pm$  DP de 4 experimentos. \*  $P < 0,05$  (teste  $t$  Student).

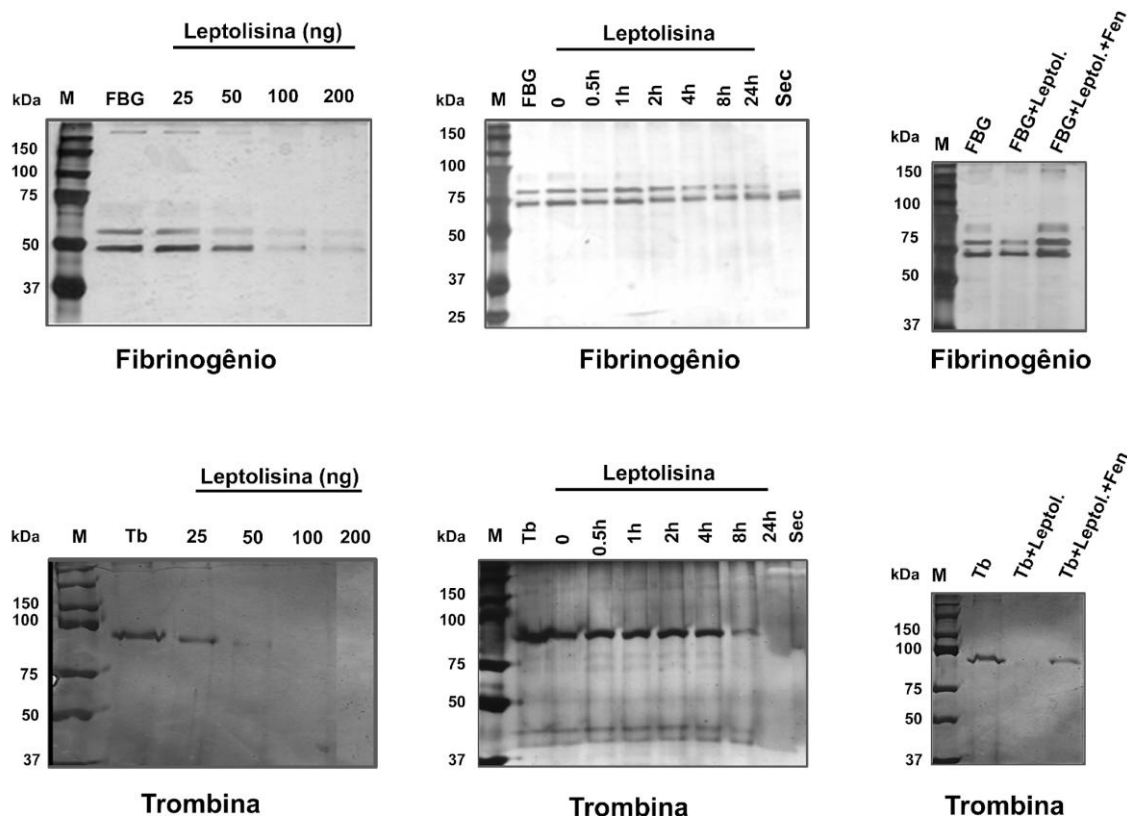
## 4.7. AÇÃO DA LEPTOLISINA NA COAGULAÇÃO E NA INFLAMAÇÃO

### 4.7.1. Degradação de fibrinogênio e trombina

O fibrinogênio é uma glicoproteína solúvel sintetizada no fígado pelos hepatócitos e desempenha um papel importante na coagulação sanguínea. Possui uma concentração de cerca de 2 a 4,5 mg/mL no plasma e também está presente em quantidades substanciais nas plaquetas. É uma molécula dimérica constituída por três pares de cadeias polipeptídicas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) ligadas umas as outras por pontes dissulfeto. Os pesos moleculares individuais das três cadeias são de aproximadamente  $A\alpha$  63,5 kDa,  $B\beta$  56 kDa e  $\gamma$  47 kDa e sua massa molecular total é estimada em 340 kDa (HALKIER, 1991). Quando clivada pela trombina, a molécula de fibrinogênio gera fibrina, um componente estrutural essencial dos coágulos, impedindo assim, a perda de sangue (ADAMCZYK et al., 2012). Fibrinogênio também está associado a diversas patologias, incluindo trombose e hemorragias (RAYNAL et al., 2013).

A trombina, por sua vez, é uma serinoprotease de 37 kDa que atua na conversão do fibrinogênio solúvel em filamentos insolúveis de fibrina, além de catalisar outras reações relacionadas à coagulação.

Assim como para os demais substratos testados (proteínas da matriz extracelular e do sistema complemento), 0,1  $\mu$ g de leptolisina foi suficiente para degradar totalmente a cadeia  $\alpha$  e parcialmente as cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  do fibrinogênio (Figura 28A). A cadeia  $\alpha$  já começa a desaparecer após 30 min de incubação, mas a cadeia  $\beta$  só é degradada parcialmente após 24 h de exposição à leptolisina (Figura 28B). Nota-se que a degradação desta molécula é muito mais eficiente quando se usa o sobrenadante bacteriano (LPF + FBG), o que indica a presença de outras proteases secretadas no meio de cultura responsáveis pela degradação de fibrinogênio. A degradação da trombina já começa a ocorrer com 0,025  $\mu$ g de leptolisina (Figura 28D), mas leva de 8 a 24 h para se completar (Figura 28E). A inativação do fibrinogênio e da trombina foi inibida por 1,10 fenantrolina (Figura 28C,F).

**Figura 28.** Degradação do fibrinogênio e da trombina pela leptolisina

(A) Fibrinogênio (10 µg) e (D) trombina (1 µg) foram incubados com 25, 50, 100 ou 200 ng de leptolisina recombinante por 24 h. Como controle, os substratos foram incubados apenas com PBS. (B) Fibrinogênio (10 µg) e (E) trombina (1 µg) foram incubados com 100 ng de leptolisina recombinante pelos tempos indicados. Como controles, os substratos foram incubados apenas com PBS pelo período máximo (24 h), assim como o controle positivo, produto de incubação do sobrenadante da cepa virulenta LPF com o substrato purificado. (C) Fibrinogênio (10 µg) e (F) trombina (1 µg) foram incubados com 100 ng de leptolisina recombinante com ou sem 1,10 fenantrolina. Como controle, os substratos foram incubados apenas com PBS. Os produtos de degradação foram analisados em géis corados por prata. FBG: fibrinogênio, Tb: trombina, Fen: 1,10 fenantrolina. M: Marcador *Kaleidoscope* (Invitrogen).

#### 4.7.2. Efeito da leptolisina no tempo de coagulação

Ao ser clivado pela trombina em condições normais, o fibrinogênio se transforma em fibrina, que por sua vez ajuda na formação do tampão plaquetário. Com o objetivo de avaliar as consequências da degradação de fibrinogênio e trombina pela leptolisina, e visando investigar se este fato poderia gerar desequilíbrios no funcionamento da cascata de coagulação, realizou-se um ensaio para aferir o tempo de coagulação em plasmas tratados com a protease. Utilizou-se tromboelastografia rotacional, que avalia as propriedades viscoelásticas do sangue, e a coagulação de forma rápida e qualitativa. A

incubação do plasma (pool) com a leptolisina aumentou o tempo de coagulação comparado ao controle, chegando a abolir o processo nas doses da protease iguais ou superiores a 0,6 µg (Tabela 6). Em suma, a protease parece ter efeito anti-coagulante. Os mecanismos subjacentes ao efeito observado deverão ser melhor explorados.

**Tabela 6.** Tempo de coagulação de plasma humano tratado com leptolisina

Plasma humano citratado	Tempo de coagulação (seg) experimento 1	Tempo de coagulação (seg) experimento 2
Controle	1287	853
Controle (+ TTPa)	454	350
0,15 µg leptolisina	398	549
0,3 µg leptolisina	618	840
0,6 µg leptolisina	não coagulou até 1800 seg	não coagulou até 1800 seg
0,12 µg leptolisina	não coagulou até 1800 seg	não coagulou até 1800 seg

#### 4.7.3. Ação da leptolisina sobre a microcirculação por microscopia intravital

A microscopia intravital é uma abordagem baseada em microscopia de luz que permite visualizar a rede microcirculatória e as rotas celulares, como rolagem de leucócitos e migração, *in vivo*. Nos ensaios, foram utilizados 3 animais para cada concentração de leptolisina recombinante testada. O teor de endotoxina na proteína utilizada foi estimado pelo teste de *Limulus* (LAL) e mostrou-se inferior à dose mínima requerida para estimular um processo inflamatório (pelo menos no que tange aos efeitos observados neste modelo). O valor estimado foi de 11,6 EU / mL.

Na concentração de 0,5 µg, 10 min após a aplicação tópica da protease, o número de leucócitos circulantes subiu de 20 para 175, e após 15 min já se observaram focos de adesão de leucócitos nas

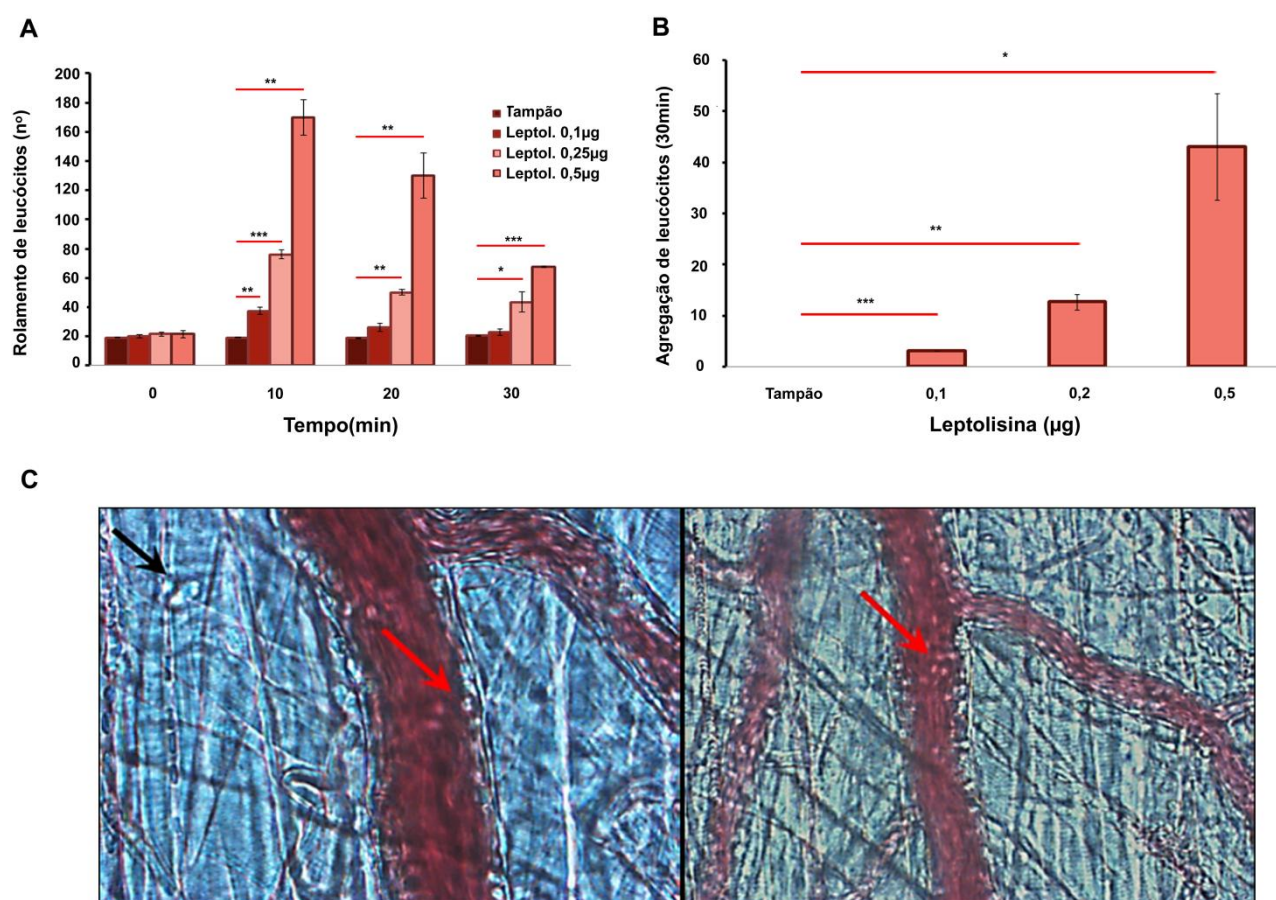
paredes dos vasos. Após 20 min observamos uma diminuição do número de leucócitos circulantes, provavelmente causada pela sua adesão na parede da vênula (aproximadamente 50 leucócitos aderidos). Após 30 min observou-se transmigração dos leucócitos para os tecidos adjacentes. Não se observou hemorragia nem alterações na arquitetura muscular.

Na concentração de 0,25  $\mu\text{g}$ , após 10 min o número de leucócitos circulantes subiu de 20 para 76. Após 20 min observaram-se focos de leucócitos aderidos, mas, em menor número que na concentração anterior. Após 30 min, o número de leucócitos aderidos foi 14. Nesta concentração não observamos transmigração, hemorragia, ou alterações musculares.

Na concentração de 0,1  $\mu\text{g}$  o aumento de leucócitos foi de 18 para 40, mostrando que mesmo nestas condições há um estímulo inflamatório e pequenos focos de agregação leucocitária. Transmigração, hemorragia e alterações musculares não foram observadas. A Figura 29 (A e B) mostra os resultados acima descritos no que diz respeito ao número de leucócitos rolantes ao longo do tempo e à agregação leucocitária utilizando-se diferentes doses de leptolisina. A Figura 29 C traz uma imagem representativa do que foi observado utilizando-se a dose de 0,5  $\mu\text{g}$  de leptolisina.



**Figura 29.** Efeito da leptolisina sobre a microcirculação por microscopia intravital



O músculo cremáster de camundongos (Balb/c) exposto e tratado com leptolisina recombinante foi avaliado por microscopia intravital. **(A)** Três animais expostos a 3 diferentes doses de leptolisina foram avaliados por 30 min e o número de leucócitos rolantes estimado. **(B)** Agregação leucocitária após 30 min de exposição a diferentes doses de leptolisina. **(C)** Imagens de uma vênula de médio calibre apresentando agregação leucocitária (setas vermelhas) após 20 minutos de exposição à leptolisina (0,5 µg). Transmigração de leucócitos para o tecido (seta preta) após 30 min de exposição à leptolisina (0,5 µg). \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  (teste *t* Student).

#### 4.8. CARACTERIZAÇÃO DA CEPA NOCAUTE PARA LEPTOLISINA ( $\Delta LIC13434$ )

##### 4.8.1. Sobrevivência de hamsters infectados com a cepa nocaute ( $\Delta lic13434$ )

Conforme mencionado, um nocaute do gene que codifica a leptolisina foi produzido para avaliar os efeitos *in vivo* da protease. Hamsters recém-desmamados são bastante utilizados como modelo da doença, sendo suscetíveis à infecção por leptospiras. A dinâmica da infecção pelo sorovar Manilae é

bastante conhecida: a cepa é extremamente virulenta, apresentando uma  $DL_{50} < 10$  (FOUTS et al., 2016). Os animais geralmente morrem entre os dias 5 e 12 pós-infecção, dependendo da dose inoculada.

Inicialmente, para comparar a virulência das cepas selvagem nocaute, grupos de 5 animais foram inoculados com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  ou  $10^4$  leptospiras por via intraperitoneal e observados por 16 dias. No primeiro ensaio (E1), realizado com leptospiras na 4ª passagem em cultura, observamos um número elevado de mortes tanto nos animais inoculados com a cepa selvagem quanto nos animais inoculados com a cepa nocaute, independentemente da quantidade de leptospiras inoculadas. Observamos um percentual global de 25% de sobrevivência nos animais inoculados com a cepa selvagem, e 35% para aqueles inoculados com a cepa nocaute. No segundo ensaio (E2), realizado com leptospiras na 11ª passagem em cultura, obtivemos um percentual de 15% de sobrevivência para a cepa selvagem e 45% para a cepa nocaute (Tabela 7).

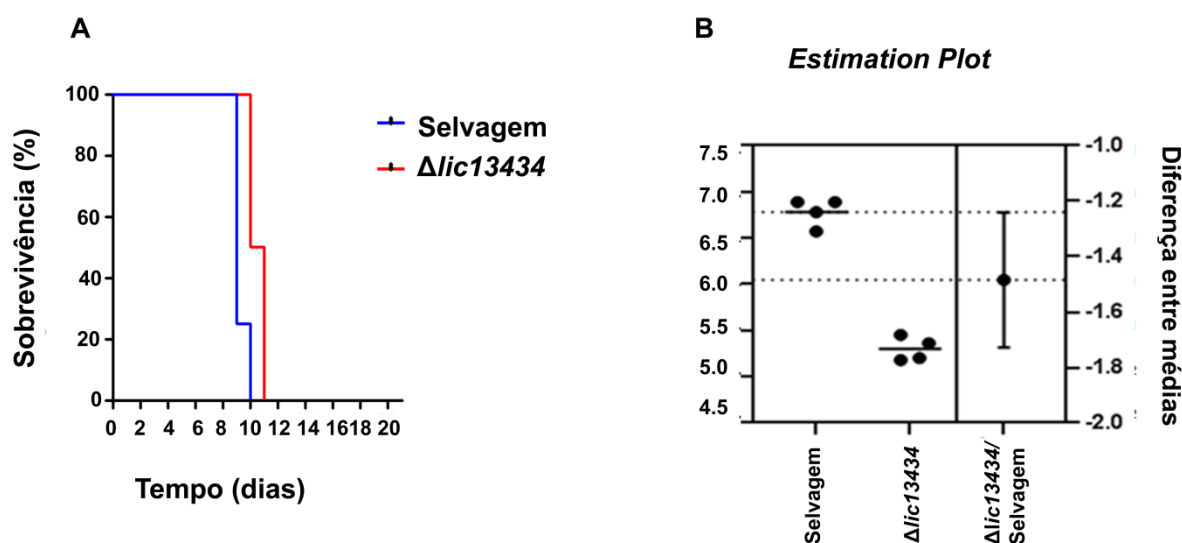
**Tabela 7.** Sobrevivência de hamsters infectados com leptospiras Manilae L495 e Manilae L495  $\Delta lic13434$

Inóculo	Sobrevivência (E1)		Sobrevivência (E2)	
	Selvagem	<i><math>\Delta lic1343</math></i>	Selvagem	<i><math>\Delta lic1343</math></i>
$10^1$	2/5	2/5	1/5	4/5
$10^2$	1/5	2/5	1/5	1/5
$10^3$	1/5	1/5	1/5	1/5
$10^4$	1/5	2/5	0/5	3/5

Um modelo de infecção epicutânea, com escarificação da pele, também foi adotado por simular de forma mais fidedigna a infecção natural. Neste modelo foram inoculadas  $10^3$  leptospiras e os

resultados mostram que não houve diferença entre os grupos: todos os animais morreram 9 ou 10 dias após a infecção (grupo selvagem) e 10 ou 11 dias após a infecção (grupo nocaute) (Figura 30A). No entanto, a carga bacteriana nos rins, estimada por PCR quantitativo, foi inferior nos órgãos dos animais nocaute (Figura 30B).

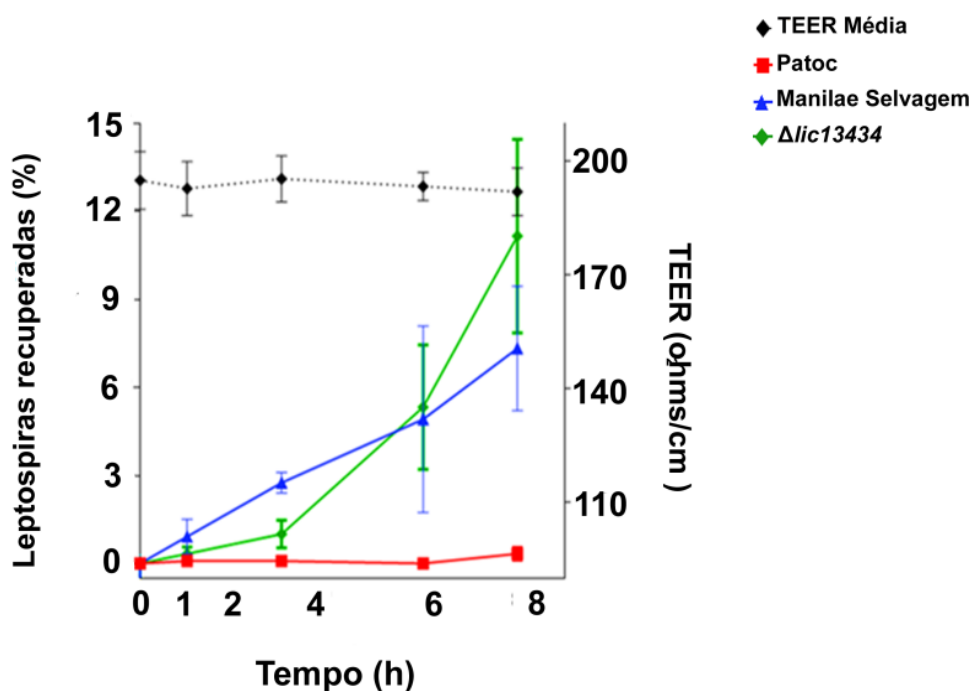
**Figura 30.** Sobrevivência de hamsters inoculados com *L. interrogans* Manilae L495 e Manilae L495  $\Delta lic13434$  e avaliação da carga bacteriana nos rins dos animais



(A) Grupos de 4 hamsters foram infectados pela pele (infecção epicutânea) com  $10^3$  leptospiras e as mortes foram registradas a cada 24 h. (B) DNA genômico extraído dos rins dos animais foi analisado por qPCR em duplicata com primers de *lipL32* para quantificar a carga de leptospiras nos rins, expressa como log GEq por grama de tecido.

As duas cepas também não apresentaram diferenças no que diz respeito à translocação através da monocamada de células MDCK *in vitro* (Figura 31).

**Figura 31.** Translocação de cepas de *Leptospira* através de monocamada de células MDCK



*L. interrogans* Manilae, *L. interrogans* Manilae  $\Delta lic13434$  e *L. biflexa* Patoc foram adicionadas à câmara superior do Transwell em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 100. Aliquotas (100  $\mu$ L) foram removidas da câmara inferior após 1, 3, 6 e 8 h e o número de leptospiras foi contado. Os resultados são mostrados como a média e desvio padrão de ensaios em triplicata. Eixo Y à esquerda: valores da resistência elétrica transepitelial (TEER).

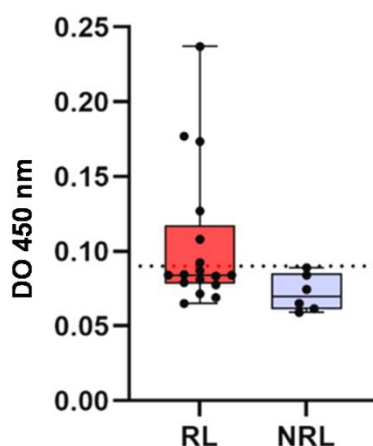
Com base nesses dados pode-se concluir que a ausência de leptolisina atenua levemente a virulência do sorovar Manilae, o que já era esperado visto que leptospiras possuem outras proteases secretadas e proteínas de superfície que agem como fatores de virulência. A leptolisina, portanto, deve fazer parte de um complexo arsenal que garante a invasão e colonização do hospedeiro, contribuindo com uma pequena parcela para a virulência da bactéria.

#### 4.9. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LEPTOLISINA EM SORO DE PACIENTES COM LEPTOSPIROSE

Com base em metodologias previamente utilizadas, o *cut-off* para determinação de positividade do ensaio foi definido como a média mais duas vezes o desvio padrão das densidades ópticas das amostras não reativas para leptospirose (NRL) (*cut-off*=0,089). Deste modo, 6 dos 17 pacientes positivos para leptospirose (RL) em testes de microaglutinação microscópica (MAT) testados (35,2%) apresentaram anticorpos específicos contra leptolisina (Figura 32). Dentre os indivíduos positivos para leptolisina, observamos uma densidade óptica média de 0,15, variando de 0,092 a 0,237. Dentre os indivíduos não reativos para leptolisina e não reativos para leptospira no MAT (NRL) observamos densidades ópticas médias de 0,079 (0,065 – 0,087) e 0,072 (0,059 – 0,088), respectivamente.

Esses dados são sugestivos de que há produção de leptolisina durante infecções naturais por leptospirosas patogênicas. No entanto, análises adicionais envolvendo um maior número de amostras de pacientes serão necessárias para corroborar esses dados, ainda preliminares.

**Figura 32.** Detecção de leptolisina em soros de pacientes com leptospirose por ELISA



Poços foram revestidos com 150 ng de leptolisina recombinante e incubados com soros de pacientes diluídos 1:100. Após 1 h de incubação e lavagens foi adicionado anti-IgG humano conjugado a peroxidase. Após a revelação, a leitura da absorbância foi feita a 450 nm. No gráfico, cada ponto representa a média de duas leituras das amostras de um mesmo paciente. RL: pacientes com leptospirose e NRL: pacientes negativos para leptospirose.

## 5. DISCUSSÃO

Metaloproteases com domínios papalisina pertencem ao clã das metzincinas, caracterizadas pelo motivo estendido HEXXHXXGXXH de ligação a zinco, e um *Met-turn* contendo metionina. Estas metaloproteases podem degradar uma série de proteínas extracelulares inespecificamente, mas também podem exibir uma atividade mais específica ao alvejar determinadas ligações peptídicas, contribuindo assim para funções fisiológicas reguladoras e de sinalização (GOMIZ-RÜTH, 2009; BRZDAK et al., 2017). A remodelação de tecidos, o desenvolvimento embrionário, a inflamação e a imunidade estão entre os processos amplamente controlados pela atividade proteolítica das metzincinas (ANTHONY e STIPANUK, 2018).

Em um trabalho anterior do grupo, análises exoproteômicas levaram à identificação de algumas peptidases, entre as quais uma proteína com domínio papalisina (da SILVA et al., 2018), à qual demos o nome de leptolisina (COURROL et al., 2022). Como a ulilisina e a mirolisina, a leptolisina pertence à categoria das papalinas pequenas. Apesar do grau relativamente baixo de identidade de sequência dentro do domínio catalítico (ulilisina e mirolisina compartilham 25% de identidade com a leptolisina), as três metaloproteases apresentam elementos de reconhecimento comuns, como sítios de ligação a cálcio, zinco e arginina, conservados em papalinas de bactérias, archaea, fungos e mamíferos. Tanto a ulilisina quanto a mirolisina sofrem ativação autolítica mediada pelo cálcio após a remoção N-terminal de seus pró-domínios. Curiosamente, a leptolisina nativa, liberada no meio extracelular, é detectada como uma única banda de ~ 50 kDa tanto em leptospiras saprófitas quanto em patogênicas (Figura 11), levando-nos a considerar que a proteína não sofre autoprocessamento apesar de abrigar um sítio Ser -Arg na posição 230.

No geral, o domínio catalítico da leptolisina é bem conservado entre as espécies de *Leptospira*. No entanto, especula-se que variações de resíduos nas proximidades do sítio catalítico, observadas em espécies de *Leptospira* pertencentes aos subclados P2 e S (Figura 6), poderiam afetar a estabilidade da protease e, eventualmente, comprometer sua ligação a determinados substratos. Alternativamente,

essas variações poderiam permitir a ligação e subsequente degradação de outros substratos, não necessariamente presentes no hospedeiro. Estudos adicionais para avaliar a funcionalidade e as especificidades das leptolisinas produzidas por espécies não patogênicas de *Leptospira* serão necessários para dar suporte a essas hipóteses.

Análises bioquímicas realizadas com a leptolisina de *L. interrogans* visaram primeiramente determinar os valores ou condições ótimas de três parâmetros físico-químicos - pH, temperatura e efeitos de cátions - para que os resultados obtidos pudessem ser utilizados em estudos posteriores de atividade hidrolítica sobre substratos FRET. O pH 8,0 foi definido como ótimo para a atividade, e a velocidade máxima de hidrólise do peptídeo Abz-GLARSNL-EDDnp foi observada a 37°C. Por fim, a atividade hidrolítica da leptolisina foi influenciada positivamente por cátions monovalentes, especialmente sódio e potássio, mas foi negativamente afetada por íons bivalentes, como magnésio e cálcio. A inibição da leptolisina por cátions bivalentes pode resultar da competição com o íon zinco presente no sítio ativo, causando sua substituição e, assim, desestabilização da enzima (DUDEV e LIM, 2001; RAWLINGS et al., 2018). A utilização de um maior número de substratos será necessária para um estudo mais preciso da especificidade primária, mas os resultados preliminares aqui apresentados, utilizando os pontos de clivagem obtidos com cinco peptídeos FRET utilizados para estudar metaloproteases (CAJADO-CARVALHO et al., 2019), forneceu informações relevantes sobre as preferências da leptolisina para a hidrólise dos substratos. Alta preferência por arginina no subsítio S1 da leptolisina foi observada. No entanto, resíduos de arginina também foram encontrados na posição P1'. O subsítio S3 apresentou boa interação com aminoácidos hidrofóbicos, como leucina e fenilalanina, enquanto glutamina e leucina foram encontradas na posição P2. Assim, a especificidade da leptolisina para a hidrólise dos substratos pode diferir daquelas relatadas para ulilisina, mirolisina, PAPP-A e PAPP-A2 humanas, que apresentam preferências por resíduos de arginina e lisina na posição P1' de seus substratos, embora substratos com fenilalanina e asparagina nesta posição também tenham sido relatados (CONOVER, 1995; BOLDT et al., 2001; OVERGAARD et al., 2001;

LAURSEN et al., 2002a, 2002b; TALLANT et al., 2006, 2007; KONERU et al., 2017). Diferenças entre as estruturas primárias e terciárias observadas entre a leptolisina e as outras metaloproteases analisadas poderiam refletir diferenças nas especificidades primárias.

As *SLRP*, incluindo decorina, biglicam, mimecam e lumicam, estão ubiquamente presentes na matriz extracelular e estão envolvidas na organização da matriz, e na regulação do crescimento e sinalização celular (APPUNNI et al., 2019). Como as moléculas da matriz e do plasma do hospedeiro são suscetíveis à degradação pelas metaloproteases de *Leptospira* liberadas no meio extracelular (da SILVA et al., 2018), a leptolisina de *L. interrogans* foi então avaliada quanto à capacidade de hidrolisar proteoglicanas e fibronectina plasmática. Todos os substratos proteicos foram eficientemente degradados ao longo do tempo, confirmando a atividade de amplo espectro da leptolisina *in vitro*. A degradação *in vivo* da fibronectina derivada da pele de camundongos também foi observada em animais inoculados intradermicamente com leptolisina. Focos hemorrágicos decorrentes da desestabilização da microvasculatura local foram observados próximos aos locais de inoculação e podem estar associados ao desarranjo da matriz extracelular e dano ao glicocálix do endotélio vascular.

Os efeitos citopáticos da leptolisina de *L. interrogans* também foram avaliados em células HK-2, uma linhagem humana de células epiteliais renais oriunda de túbulos proximais. Um efeito dependente da dose foi claramente evidente após o tratamento. O descolamento das células pode ser parcialmente atribuído à degradação da fibronectina, embora outras macromoléculas da matriz também devam ter sido afetadas pela leptolisina. Para avaliar se a leptolisina também teria como alvo as junções celulares, duas moléculas que compõem as *tight junctions* foram avaliadas: ocludina e zonula occludens-1 (ZO-1). A marcação de ZO-1 nas células tratadas parece menos intensa em comparação com o controle, mas não se sabe se este padrão levemente alterado resulta da ação direta da protease ou se decorre da degradação da matriz ao redor das células. Curiosamente, em células endoteliais linfáticas da derme (HDLEC) infectadas com *L. interrogans* sorovar Copenhageni, o sinal de



fluorescência de ZO-1 foi evidenciado intracelularmente (SATO e COBURN, 2017). Nas células epiteliais de túbulos proximais renais (RPTECs) a infecção por *L. interrogans* causou a desorganização do complexo juncional apical, gerando uma localização incorreta de ZO-1 e de outras proteínas do complexo, bem como rearranjo do citoesqueleto (SEBASTIÁN et al., 2021). A análise de um painel mais amplo de proteínas da matriz e de proteínas que compõem as junções célula-célula ajudará a elucidar os alvos primários da leptolisina e seu papel na disseminação da *Leptospira* dentro do hospedeiro.

A ação da leptolisina sobre moléculas do sistema complemento também foi avaliada neste trabalho. A protease recombinante apresentou atividade proteolítica sobre as proteínas efetoras purificadas C2, C3, C3b, C4, C4b, C5, C6, C7, C8 e C9 (Figura 22). Foi também capaz de degradar parcialmente as moléculas C3, C4 e C5 do soro humano (Figura 25). Essa ação proteolítica foi confirmada tratando-se o soro com a protease que, inativando moléculas do complemento, permitiu a sobrevivência da cepa saprófita Patoc I (normalmente suscetível à atividade bactericida do soro mediada pelo complemento) (Figura 26). Ainda, a cepa nocaute para leptolisina apresentou sobrevivência reduzida em soro humano normal (Figura 27), e o sobrenadante de cultura desta cepa não apresentou ação proteolítica sobre a maioria dos componentes purificados do sistema complemento (Figura 24). Esse conjunto de dados é sugestivo de que a leptolisina possa contribuir para a persistência das bactérias na circulação durante a infecção. A secreção de proteases que alvejam moléculas do sistema complemento é um dos mecanismos adotados por leptospiros patogênicos para sobreviver na circulação, mas a esta estratégia somam-se outras, como a aquisição de reguladores negativos deste sistema, garantindo a inativação da cascata potencialmente pelas três vias: clássica, das lectinas e alternativa (MERI et al., 2005; BARBOSA et al., 2009; FRAGA et al., 2014). O escape, ainda que parcial, à ação lítica do complemento na circulação permite a colonização de órgãos-alvo pelas bactérias e o consequente dano aos tecidos.

Curiosamente, algumas das características encontradas na leptolisina são compartilhadas pela protease palilisina (Tp0751), produzida por outra espiroqueta, *Treponema pallidum*, agente causador da sífilis. Descrita como tendo atividades proteolíticas e de adesão (HOUSTON et al., 2011, 2012; LITHGOW et al., 2020), Tp0751 é uma metaloprotease dependente de zinco contendo histidinas conservadas envolvidas na ligação a metais (HEXXH). Em associação com *T. pallidum* Tp0750, que contém um domínio do tipo A do fator Von Willebrand, Tp0751 promove fibrinólise e degradação da matriz (HOUSTON et al., 2012, 2014). Tanto a palilisina quanto a leptolisina possuem ação fibrinogenolítica. O importante papel do fibrinogênio na resposta antimicrobiana é inquestionável, mas patógenos de relevância médica desenvolveram estratégias bem-sucedidas para interagir com o fibrinogênio do hospedeiro e usá-lo em seu favor. Fatores de virulência bacterianos alvejam moléculas da cascata de coagulação do hospedeiro de diversas maneiras: simplesmente interagem com fibrinogênio ou fibrina, promovem a formação ou dissolução dos polímeros de fibrina, ou ainda produzem fatores que promovem a formação de matrizes de fibrina ou fatores com ação fibrinolítica (revisado em KO e FLICK, 2016). Alterações na função da cascata de coagulação do hospedeiro podem beneficiar a disseminação do patógeno, assegurando sua sobrevivência. Ainda, uma resposta descontrolada da coagulação em decorrência de uma infecção pode levar a coagulação intravascular disseminada (DIC), uma coagulopatia de consumo. Isquemia, inflamação, hemorragias e choque decorrentes da DIC podem causar morte séptica. Esse quadro é relatado em pacientes com leptospirose grave que vieram a óbito. Esses pacientes apresentaram distúrbios tanto na coagulação quanto nas vias fibrinolíticas (WAGENAAR et al., 2010). Interessante ressaltar que o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) - que mede o tempo de coagulação a partir da ativação do fator XII até a formação do coágulo de fibrina, avaliando as vias intrínseca e comum da coagulação – aumenta progressivamente no plasma tratado com doses crescentes de leptolisina (Tabela 6). Nas doses mais elevadas não se observou a formação de coágulos de fibrina. De acordo com os dados apresentados na Figura 28, a leptolisina degrada 2 componentes da via comum da coagulação:

fibrinogênio e trombina. Resta investigar se fatores da via intrínseca também seriam alvo desta protease de *Leptospira*.

Neste trabalho, a microcirculação do músculo cremáster foi usada como modelo para analisar a migração de leucócitos, como medida da inflamação (PERAZZO et al., 2017). Aumento da permeabilidade vascular, modificação no calibre dos vasos e no fluxo sanguíneo, e exsudação de plasma e de células para o meio extravascular são algumas das principais alterações que ocorrem nos vasos sanguíneos da microcirculação nas primeiras horas após uma injúria. A administração tópica da leptolisina sobre o músculo elevou o número de leucócitos circulantes nos primeiros minutos e, na sequência, focos de adesão de leucócitos nas paredes dos vasos foram observados. Em seguida, notou-se uma diminuição do número de leucócitos circulantes, provavelmente devido a sua adesão na parede da vênula. Por fim, observou-se transmigração dos leucócitos para os tecidos adjacentes. Esse conjunto de dados é sugestivo de que a leptolisina induz uma resposta inflamatória.

Por fim, foram realizados ensaios *in vivo* para avaliar a virulência da cepa nocaute para leptolisina. Aparentemente, não houve atenuação da virulência, uma vez que todos os animais inoculados tanto com a cepa selvagem quanto com a cepa nocaute vieram a óbito entre os dias 9 e 11 pós-infecção (Figura 30). Da mesma forma, não houve diferença na capacidade de translocação de monocamadas de células comparando-se as 2 cepas (Figura 31). A viabilidade desta cepa nocaute poderia ser, eventualmente, explicada por um mecanismo de compensação genética, que atribui a ausência de fenótipo em nocautes à regulação positiva de outros genes que garantiriam o *fitness* do organismo nocauteado. Essa hipótese, meramente especulativa, mereceria ser melhor investigada no caso da leptolisina. No entanto, a carga bacteriana nos rins foi menor nos animais infectados com a cepa nocaute. Isso provavelmente reflete a menor capacidade desta cepa em resistir à atividade bactericida do soro mediada pelo sistema complemento, fazendo com que um menor número de bactérias atinja órgãos-alvo.

## 6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste trabalho e levando-se em conta que leptospiras patogênicas secretam collagenases e termolisinas, além da leptolisina, é plausível supor que proteases de *Leptospira* desempenham um papel importante em todas as fases do processo infeccioso: i) durante a entrada e disseminação bacteriana podem contribuir para a degradação tecidual; ii) ao degradar as proteínas efetoras do complemento na corrente sanguínea, as proteases secretadas podem permitir a persistência e, finalmente, iii) podem causar dano tecidual ao induzir inflamação, lesão vascular e hemorragias (MURRAY, 2015). Portanto, a caracterização dessas toxinas, seus substratos e mecanismos de ação podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para mitigar os danos causados pela infecção com esta bactéria espiroqueta.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZYK Z, CICHOCKI B, EKIEL-JEŻEWSKA ML, SŁOWICKA A, WAJNRYB E, WASILEWSKA M. Fibrinogen conformations and charge in electrolyte solutions derived from DLS and dynamic viscosity measurements. **J Colloid Interface Sci**, 385, 1, 244-57, novembro, 2012.

ADLER B, DE LA PEÑA MOCTEZUMA A. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol**, 140, 3-4, 287-96, março, 2010.

ANTHONY TG, ANAND V, STIPANUK MH. Protein and amino acid metabolism, Biochemical, physiological, and molecular aspects of human nutrition, 4th ed., **Elsevier**, 402–443, abril, 2018.

APPUNNI S, ANAND V, KHANDELWAL M, GUPTA N, RUBENS M, SHARMA A. Small Leucine Rich Proteoglycans (decorin, biglycan and lumican) in cancer. **Clin Chim Acta**, 491, 1, 1-7, abril, 2019.

ASEGA AF, MENEZES MC, TREVISAN-SILVA D, CAJADO-CARVALHO D, BERTHOLIM L, OLIVEIRA AK, ZELANIS A, SERRANO SMT. Cleavage of proteoglycans, plasma proteins and the platelet-derived growth factor receptor in the hemorrhagic process induced by snake venom metalloproteinases. **Sci Rep**, 10, 1, 12912, julho, 2020.

BAEK M, DIMAIO F, ANISHCHENKO I, DAUPARAS J, OVCHINNIKOV S, LEE GR, WANG J, CONG Q, KINCH LN, SCHAEFFER RD, MILLÁN C, PARK H, ADAMS C, GLASSMAN CR, DEGIOVANNI A, PEREIRA JH, RODRIGUES AV, VAN DIJK AA, EBRECHT AC, OPPERMAN DJ, SAGMEISTER T, BUHLHELLER C, PAVKOV-KELLER T, RATHINASWAMY MK, DALWADI U, YIP CK, BURKE JE, GARCIA KC, GRISHIN NV, ADAMS PD, READ RJ, BAKER D. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. **Science**, 373, 6557, 871-876, agosto, 2021.

BARBOSA AS, ABREU PA, VASCONCELLOS SA, MORAIS ZM, GONÇALES AP, SILVA AS, DAHA MR, ISAAC L. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator c4bp. **Infect Immun**, 77, 3, 1137–1143, março, 2009.

BOLDT HB, OVERGAARD MT, LAURSEN LS, WEYER K, SOTTRUP-JENSEN L, OXVIG C. Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): classification as a metzincin. **Biochem J**, 358,2, 359-67, setembro, 2001.

Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Coordenação geral de desenvolvimento da epidemiologia em serviços. Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico, [recurso-eletrônico], Brasília, Ministério da Saúde, p. 9-15, 2014.

Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação geral de desenvolvimento da epidemiologia em serviços. Guia de vigilância em saúde: [recurso eletrônico], Brasília, Ministério da Saúde, p. 621-641, 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação geral de desenvolvimento da epidemiologia em serviços. Guia de vigilância em saúde: [recurso eletrônico], Brasília, Ministério da Saúde, p. 342-364, 2021.

BRZDAK P, NOWAK D, WIERA G, MOZRZYMAS JW. Multifaceted Roles of Metzincins in CNS Physiology and Pathology: From Synaptic Plasticity and Cognition to Neurodegenerative Disorders. **Front Cell Neurosci**, 30, 11, 178, junho, 2017.

CAIMI K, RUYBAL P. *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. **Infect Genet Evol**, 81, 1, 104241, julho, 2020.

CAJADO-CARVALHO D, DA SILVA CCF, KODAMA RT, MARIANO DOC, PIMENTA DC, DUZZI B, KUNIYOSHI AK, PORTARO FV. Purification and Biochemical Characterization of TsMS 3 and TsMS 4: Neuropeptide-Degrading Metallopeptidases in the *Tityus serrulatus* Venom. **Toxins (Basel)**, 11, 4, 194, março, 2019.

CASANOVAS-MASSANA A, HAMOND C, SANTOS LA, DE OLIVEIRA D, HACKER KP, BALASSIANO I, COSTA F, MEDEIROS MA, REIS MG, KO AI, WUNDER EA. *Leptospira yasudae* sp. nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources. **Int J Syst Evol Microbiol**, 70, 3, 1450-1456, março, 2020.

CHAGNOT C, LISTRAT A, ASTRUC T, DESVAUX M. Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components. **Cell Microbiol**, 14, 11, 1687-96, novembro, 2012.

CHURA-CHAMBI RM, NAKAJIMA E, DE CARVALHO RR, MIYASATO PA, OLIVEIRA SC, MORGANTI L, MARTINS EA. Refolding of the recombinant protein Sm29, a step toward the production of the vaccine candidate against schistosomiasis. **J Biotechnol**, 168, 4, 511-9, dezembro, 2013.

COLAERT N, HELSENS K, MARTENS L, VANDEKERCKHOVE J, GEVAERT K. Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo. **Nat Methods**, 11, 786-7, novembro, 2019.

CONOVER CA. Insulin-like growth factor binding protein proteolysis in bone cell models. **Prog Growth Factor Res**, 6, 2-4, 301-9, junho, 1995.

COSTA F, HAGAN JE, CALCAGNO J, KANE M, TORGERSON P, MARTINEZ-SILVEIRA MS, STEIN C, ABELA-RIDDER B, KO AI. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**, 9, 9, e0003898, setembro, 2015.

COURROL DDS, DA SILVA CCF, PRADO LG, CHURA-CHAMBI RM, MORGANTI L, DE SOUZA GO, HEINEMANN MB, ISAAC L, CONTE FP, PORTARO FCV, RODRIGUES-DASILVA RN, BARBOSA AS. Leptolysin, a *Leptospira* secreted metalloprotease of the pappalysin family with broad-spectrum activity. **Front Cell Infect Microbiol**, 23, 12, 966370, agosto, 2022.

DA SILVA LB, MENEZES MC, KITANO ES, OLIVEIRA AK, ABREU AG, SOUZA GO, HEINEMANN MB, ISAAC L, FRAGA TR, SERRANO SMT, BARBOSA AS. *Leptospira interrogans* Secreted Proteases Degrade Extracellular Matrix and Plasma Proteins From the Host. **Front Cell Infect Microbiol.** 27, 8, 92, março, 2018.

DALTON CJ, LEMMON CA. Fibronectin: Molecular Structure, Fibrillar Structure and Mechanochemical Signaling. **Cells**, 10, 9, 2443, setembro, 2021.

DEJANA E, TOURNIER-LASSERVE E, WEINSTEIN BM. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. **Dev Cell**, 16, 2, 209-21, fevereiro, 2009.

DUDEV T., LIM C. Metal selectivity in metalloproteins: Zn<sup>2+</sup> vs. Mg<sup>2+</sup> J. **Phys Chem B**, 1, 105,4446–4452, janeiro, 2001.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis*. 2. Ed. Melbourne, Medisci, p. 353. 1999.

FIGUEIRA CP, CRODA J, CHOY HA, HAAKE DA, REIS MG, KO AI, PICARDEAU M. Heterologous expression of pathogen-specific genes ligA and ligB in the saprophyte *Leptospira biflexa* confers enhanced adhesion to cultured cells and fibronectin. **BMC Microbiol**, 9,11,129, junho, 2011.

FORSTER RP. Kidney, water, and electrolytes. **Annu Rev Physiol**,27, 183-232,1965.

FOUTS DE, MATTHIAS MA, ADHIKARLA H, ADLER B, AMORIM-SANTOS L, BERG DE, BULACH D, BUSCHIAZZO A, CHANG YF, GALLOWAY RL, HAAKE DA, HAFT DH, HARTSKEERL R, KO AI, LEVETT PN, MATSUNAGA J, MECHALY AE, MONK JM, NASCIMENTO AL, NELSON KE, PALSSON B, PEACOCK SJ, PICARDEAU M, RICARDI JN, THAIPANDUNGPANIT J, WUNDER EA JR, YANG XF, ZHANG JJ, VINETZ JM. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?:Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, 2, e0004403, fevereiro, 2016.

FRAGA TR, BARBOSA AS, ISAAC L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scand J Immunol**, 73, 5, 408-19, maio, 2011.

FRAGA TR, COURROL DDOS S, CASTIBLANCO-VALENCIA MM, HIRATA IY, VASCONCELLOS SA, JULIANO L, BARBOSA AS, ISAAC L. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. **J Infect Dis**, 209, 6, 876-86, março, 2014.

GARCÍA-CASTELLANOS R, TALLANT C, MARRERO A, SOLÀ M, BAUMANN U, GOMIS-RÜTH FX. Substrate specificity of a metalloprotease of the pappalysin family revealed by an inhibitor and a product complex. **Arch Biochem Biophys**, 457, 1, 57-72, janeiro, 2007.

GOMIS-RÜTH FX. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. **J Biol Chem**, 284, 23, 15353-7, junho, 2009.

GOSTIC KM, WUNDER EA JR, BISHT V, HAMOND C, JULIAN TR, KO AI, LLOYD-SMITH JO. Mechanistic dose-response modelling of animal challenge data shows that intact skin is a crucial barrier to leptospiral infection. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 374, 1782, 20190367, Setembro, 2019.

GUEVARA T, RODRIGUEZ-BANQUERI A, KSIAZEK M, POTEMPA J, GOMIS-RÜTH FX. Structure-based mechanism of cysteine-switch latency and of catalysis by pappalysin-family metalloproteases. **IUCrJ**, 7, 1, 18-29, janeiro, 2020.

HARTSKEERL RA, COLLARES-PEREIRA M, ELLIS WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clin Microbiol Infect**, 17, 4, 494-501, abril, 2011.

HASHIMOTO VL, ABREU PA, CARVALHO E, GONÇALES AP, MORAIS ZM, VASCONCELLOS SA, ROMERO EC, HO PL. Evaluation of the elastinolytic activity and protective effect of Leptallo I, a protein composed by metalloprotease and FA5/8C domains, from *Leptospira interrogans Copenhageni*. **Microb Pathog**, 6, 61-62, 29-36, setembro, 2013.

HOUSTON S, HOF R, FRANCESCUTTI T, HAWKES A, BOULANGER MJ, CAMERON CE. Bifunctional role of the *Treponema pallidum* extracellular matrix binding adhesin Tp0751. **Infect Immun**, 79, 3, 1386-98, março, 2011.

HOUSTON S, HOF R, HONEYMAN L, HASSLER J, CAMERON CE. Activation and proteolytic activity of the *Treponema pallidum* metalloprotease, pallilysin. **PLoS Pathog**, 8, 7, e1002822, agosto, 2012.

HOUSTON S, RUSSELL S, HOF R, ROBERTS AK, CULLEN P, IRVINE K, SMITH DS, BORCHERS CH, TONKIN ML, BOULANGER MJ, CAMERON CE. The multifunctional role of the pallilysin-associated *Treponema pallidum* protein, Tp0750, in promoting fibrinolysis and extracellular matrix component degradation. **Mol Microbiol**, 91, 3, 618-34, fevereiro, 2014.

HUESGEN PF, LANGE PF, ROGERS LD, SOLIS N, ECKHARD U, KLEIFELD O, GOULAS T, GOMIS-RÜTH FX, OVERALL CM. LysargiNase mirrors trypsin for protein C-terminal and methylation-site identification. **Nat Methods**, 12, 1, 55-8, janeiro, 2015.

JENSEN EB, CARLSEN S. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. **Biotechnol Bioeng**, 36, 1, 1-11, junho, 1990.

JUSKO M, POTEMPA J, MIZGALSKA D, BIELECKA E, KSIAZEK M, RIESBECK K, GARRED P, EICK S, BLOM AM. A Metalloproteinase Mirolysin of *Tannerella forsythia* Inhibits All Pathways of the Complement System. **J Immunol**, 195, 5, 2231-40, setembro, 2015.



KASSEGNE K, HU W, OJCIUS DM, SUN D, GE Y, ZHAO J, YANG XF, LI L, YAN J. Identification of collagenase as a critical virulence factor for invasiveness and transmission of pathogenic *Leptospira* species. **J Infect Dis**, 209, 7, 1105-15, abril, 2014.

KIM DE, CHIVIAN D, BAKERD. Protein structure prediction and analysis using the rosetta server. **Nucleic Acids Res**, 32(web server issue): w526-531, 2004.

KO AI, GOARANT C, PICARDEAU M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat Rev Microbiol**, 7, 10, 736-47, outubro, 2009.

KO YP, FLICK MJ. Fibrinogen Is at the Interface of Host Defense and Pathogen Virulence in *Staphylococcus aureus* Infection. **Semin Thromb Hemost**, 42, 4, 408-21, junho, 2016.

KONERU L, KSIAZEK M, WALIGORSKA I, STRACZEK A, LUKASIK M, MADEJ M, THØGERSEN IB, ENGHILD JJ, POTEPA J. Mirolysin, a LysargiNase from *Tannerella forsythia*, proteolytically inactivates the human cathelicidin, LL-37. **Biol Chem**, 398, 3, 395-409, março, 2017.

LAKOWICZ JR, GRYCZYNSKI I, GRYCZYNSKI Z, DATTELBAUM JD. Anisotropy-based sensing with reference fluorophores. **Anal Biochem**, 267, 2, 397-405, fevereiro, 1999.

LAURSEN LS, OVERGAARD MT, NIELSEN CG, BOLDT HB, HOPMANN KH, CONOVER CA, SOTTRUP-JENSEN L, GIUDICE LC, OXVIG C. Substrate specificity of the metalloproteinase pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) assessed by mutagenesis and analysis of synthetic peptides: substrate residues distant from the scissile bond are critical for proteolysis. **Biochem J**, 367, 1, 31-40, outubro, 2002.

LAURSEN LS, OVERGAARD MT, WEYER K, BOLDT HB, EBBESEN P, CHRISTIANSEN M, SOTTRUP-JENSEN L, GIUDICE LC, OXVIG C. Cell surface targeting of pregnancy-associated plasma protein A proteolytic activity. Reversible adhesion is mediated by two neighboring short consensus repeats. **J Biol Chem**, 367, 5, 68-70, outubro, 2002.

LEMICHEZ E, LECUIT M, NASSIF X, BOURDOULOUS S. Breaking the wall: targeting of the endothelium by pathogenic bacteria. **Nat Rev Microbiol**, 8, 2, 93-104, fevereiro, 2010.

LENTZ EK, LEYVA-ILLADES D, LEE MS, CHERLA RP, TESH VL. Differential response of the human renal proximal tubular epithelial cell line HK-2 to Shiga toxin types 1 and 2. **Infect Immun**, 79, 9, 3527-40, setembro, 2011.

LEVETT PN. Leptospirosis. **Clin Microbiol Ver**, 14, 2, 296-326, abril, 2001.

LITHGOW KV, CHURCH B, GOMEZ A, TSAO E, HOUSTON S, SWAYNE LA, CAMERON CE. Identification of the Neuroinvasive Pathogen Host Target, LamR, as an Endothelial Receptor for the *Treponema pallidum* Adhesin Tp0751. **mSphere**, 5, 2, e00195-20, abril, 2020.

LOCKHART M, WIRRIE E, PHELPS A, WESSELS A. Extracellular matrix and heart development. **Birth defects research (part a)**, Clinical and Molecular Teratology, 91, 535-550. 2011.

MADATHIPARAMBIL MG, CATTAVARAYANE S, PERUMANA SR, MANICKAM GD, SEHGAL SC. Presence of 46 kDa gelatinase on the outer membrane of *Leptospira*. **Curr Microbiol**, 62, 5, 1478-82, maio, 2011.

MERI T, MURGIA R, STEFANEL P, MERI S, CINCO M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. **Microb Pathog**, 39, 4, 139-47, outubro, 2005.

MURRAY GL. The molecular basis of leptospiral pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**, 387,139-85, março, 2015.

OVERGAARD MT, BOLDT HB, LAURSEN LS, SOTTRUP-JENSEN L, CONOVER CA, OXVIG C. Pregnancy-associated plasma protein-A2 (PAPP-A2), a novel insulin-like growth factor-binding protein-5 proteinase. **J Biol Chem**, 276, 24, 21849-53, junho, 2001.

OXVIG C. The role of PAPP-A in the IGF system: location, location, location. **J Cell Commun Signal**, 9, 2, 177-87, junho, 2015.

PERAZZO J, LIMA C, HERAS M, BARDAJI E, LOPES-FERREIRA M, CASTANHO M. Neuropeptide kyotorphin impacts on lipopolysaccharide-induced glucocorticoid-mediated inflammatory response. A molecular link to nociception, neuroprotection, and anti-inflammatory action. **Acs Chem Neurosci**, 8, 8, 1663-1667, agosto, 2017.

RAMOS CR, ABREU PA, NASCIMENTO AL, HO PL. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz J Med Biol Res**, 37, 8, 1103-9, agosto, 2004.

RAWLINGS ND, BARRETT AJ, THOMAS PD, HUANG X, BATEMAN A, FINN RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Res**, 46, 1, D624-D632, janeiro, 2018.

RAYNAL B, CARDINALI B, GRIMBERGEN J, PROFUMO A, LORD ST, ENGLAND P, ROCCO M. Hydrodynamic characterization of recombinant human fibrinogen species. **Thromb Res**, 132, 1, e48-53, julho, 2013.

RISTOW P, BOURHY P, KERNEIS S, SCHMITT C, PREVOST MC, LILENBAUM W, PICARDEAU M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology (Reading)**, 154, 5, 1309-1317, maio, 2008.

SAMBROOK J, FRITSCH E, MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2<sup>o</sup>ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 3 vs. 1989.

SATO H, COBURN J. *Leptospira interrogans* causes quantitative and morphological disturbances in adherens junctions and other biological groups of proteins in human endothelial cells. **PLoS Negl Trop Dis**, 11, 7, e0005830, julho, 2017.

SEBASTIÁN I, OKURA N, HUMBEL BM, XU J, HERMAWAN I, MATSUURA C, HALL M, TAKAYAMA C, YAMASHIRO T, NAKAMURA S, TOMA C. Disassembly of the apical junctional complex during the transmigration of *Leptospira interrogans* across polarized renal proximal tubule epithelial cells. **Cell Microbiol**, 23, 9, e13343, setembro, 2021.

STODDARD RA, GEE JE, WILKINS PP, MCCAUSTLAND K, HOFFMASTER AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 64, 3, 247-55, julho, 2009.

STOLL VS, BLANCHARD JS. Buffers: principles and practice. **Methods Enzymol**, 182, 24-38, janeiro, 1990.

SVENSSON L, OLDBERG A, HEINEGÅRD D. Collagen binding proteins. **Osteoarthritis Cartilage**, 9, 23-8, setembro, 2001.

TALLANT C, GARCÍA-CASTELLANOS R, MARRERO A, CANALS F, YANG Y, REYMOND JL, SOLÀ M, BAUMANN U, GOMIS-RÜTH FX. Activity of ulilysin, an archaeal PAPP-A-related gelatinase and IGFBP protease. **Biol Chem**, 388, 11, 1243-53, novembro, 2007.

TALLANT C, GARCÍA-CASTELLANOS R, SECO J, BAUMANN U, GOMIS-RÜTH FX. Molecular analysis of ulilysin, the structural prototype of a new family of metzincin metalloproteases. **J Biol Chem**, 281, 26, 17920-8, junho, 2006.

TIAN, Y. C. et al. Leptospiral outer membrane protein induces extracellular matrix accumulation through a TGF- $\beta$ 1/Smad-dependent pathway. **Journal of the American Soc Neph**, 17, 10, 2792-2798, 2006.

VINCENT AT, SCHIETTEKATTE O, GOARANT C, NEELA VK, BERNET E, THIBEAUX R, ISMAIL N, MOHD KHALID MKN, AMRAN F, MASUZAWA T, NAKAO R, AMARA KORBA A, BOURHY P, VEYRIER FJ, PICARDEAU M. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Negl Trop Dis**, 13, 5, e0007270, maio, 2019.

WAGENAAR JF, GORIS MG, PARTININGRUM DL, ISBANDRIO B, HARTSKEERL RA, BRANDJES DP, MEIJERS JC, GASEM MH, VAN GORP EC. Coagulation disorders in patients with severe leptospirosis are associated with severe bleeding and mortality. **Trop Med Int Health**, 15, 2, 152-9, fevereiro, 2010.

WILLIAMS CJ, HEADD JJ, MORIARTY NW, PRISANT MG, VIDEAU LL, DEIS LN, VERMA V, KEEDY DA, HINTZE BJ, CHEN VB, JAIN S, LEWIS SM, ARENDALL WB 3RD, SNOEYINK J, ADAMS PD, LOVELL SC, RICHARDSON JS, RICHARDSON DC. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Sci**, 27, 1, 293-315, janeiro, 2018.

WUNDER EA JR, FIGUEIRA CP, BENAROUDJ N, HU B, TONG BA, TRAJTENBERG F, LIU J, REIS MG, CHARON NW, BUSCHIAZZO A, PICARDEAU M, KO AI. A novel flagellar sheath

protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete. **Mol Microbiol**, 101, 3, 457-70, agosto, 2016.

YUN B, ZHANG T, AZAD MAK, WANG J, NOWELL CJ, KALITSIS P, VELKOV T, HUDSON DF, LI J. Correction to: Polymyxin B causes DNA damage in HK-2 cells and mice. **Arch Toxicol**. 92, 7,2273-2274, julho, 2018.


ZAK KM, BOSTOCK MJ, WALIGORSKA I, THØGERSEN IB, ENGHILD JJ, POPOWICZ GM, GRUDNIK P, POTEMPA J, KSIAZEK M. Latency, thermal stability, and identification of an inhibitory compound of mirolysin, a secretory protease of the human periodontopathogen *Tannerella forsythia*. **J Enzyme Inhib Med Chem**, 36, 1, 1267-1281, dezembro, 2021.

# **ANEXOS**

Anexo 1. COURROL DDS, DA SILVA CCF, PRADO LG, CHURA-CHAMBI RM, MORGANTI L, DE SOUZA GO, HEINEMANN MB, ISAAC L, CONTE FP, PORTARO FCV, RODRIGUES-DA-SILVA RN, BARBOSA AS. *Leptolysin, a Leptospira secreted metalloprotease of the pappalysin family with broad-spectrum activity. Front Cell Infect Microbiol*, 23, 12, 966370, agosto, 2022.

**frontiers** | Frontiers in Cellular and Infection Microbiology

TYPE Original Research  
PUBLISHED 23 August 2022  
DOI 10.3389/fcimb.2022.966370

 Check for updates

**OPEN ACCESS**

EDITED BY  
Jan Potempa,  
University of Louisville, United States

REVIEWED BY  
Sabina Kędzierska-Mieszkowska,  
University of Gdansk, Poland  
Jon Skare,  
Texas A&M Health Science Center,  
United States

\*CORRESPONDENCE  
Angela Silva Barbosa  
angela.barbosa@butantan.gov.br

SPECIALTY SECTION  
This article was submitted to  
Molecular Bacterial Pathogenesis,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular and  
Infection Microbiology

## Leptolysin, a *Leptospira* secreted metalloprotease of the pappalysin family with broad-spectrum activity

Daniella dos Santos Courrol<sup>1</sup>,  
Cristiane Castilho Fernandes da Silva<sup>2</sup>, Luan Gavião Prado<sup>1,3</sup>,  
Rosa Maria Chura-Chambi<sup>1,4</sup>, Ligia Morganti<sup>4</sup>,  
Gisele Oliveira de Souza<sup>5</sup>, Marcos Bryan Heinemann<sup>5</sup>,  
Lourdes Isaac<sup>6</sup>, Fernando Paiva Conte<sup>7</sup>,  
Fernanda Calheta Vieira Portaro<sup>2</sup>,  
Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva<sup>8</sup>  
and Angela Silva Barbosa<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Bacteriology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil, <sup>2</sup>Laboratory of Structure and Function of Biomolecules, Butantan Institute, São Paulo, Brazil, <sup>3</sup>Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>4</sup>Center of Biotechnology, Energy and Nuclear Research Institute (IPEN)-CNEN/SP, São Paulo, Brazil, <sup>5</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>6</sup>Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>7</sup>Pilot Plant Implementation Project, Immunobiological Technology Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>8</sup>Laboratory of Immunological Technology, Immunobiological Technology Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

RECEIVED 10 June 2022  
ACCEPTED 03 August 2022  
PUBLISHED 23 August 2022

CITATION  
Courrol DS, Silva CCF, Prado LG, Chura-Chambi RM, Morganti L, de Souza GO, Heinemann MB, Isaac L, Conte FP, Portaro FCV, Rodrigues-da-Silva RN and Barbosa AS (2022) Leptolysin, a *Leptospira* secreted metalloprotease of the pappalysin family with broad-spectrum activity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12:966370. doi: 10.3389/fcimb.2022.966370

COPYRIGHT  
© 2022 Courrol, Silva, Prado, Chura-Chambi, Morganti, de Souza, Heinemann, Isaac, Conte, Portaro, Rodrigues-da-Silva and Barbosa. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Extracellular proteolytic enzymes are produced by a variety of pathogenic microorganisms, and contribute to host colonization by modulating virulence. Here, we present a first characterization of leptolysin, a *Leptospira* metalloprotease of the pappalysin family identified in a previous exoproteomic study. Comparative molecular analysis of leptolysin with two other pappalysins from prokaryotes, ullysin and mirolysin, reveals similarities regarding calcium, zinc, and arginine-binding sites conservation within the catalytic domain, but also discloses peculiarities. Variations observed in the primary and tertiary structures may reflect differences in primary specificities. Purified recombinant leptolysin of *L. interrogans* was obtained as a ~50 kDa protein. The protease exhibited maximal activity at pH 8.0 and 37°C, and hydrolytic activity was observed in the presence of different salts with maximum efficiency in NaCl. Substrate specificity was assessed using a small number of FRET peptides, and showed a marked preference for arginine residues at the P1 position. *L. interrogans* leptolysin proteolytic activity on proteinaceous substrates such as proteoglycans and plasma fibronectin was also evaluated. All proteins tested were efficiently degraded over time, confirming the protease's broad-spectrum activity *in vitro*. In addition,

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 01 frontiersin.org

Anexo 2. OLIVEIRA PN, COURROL DS, CHURA-CHAMBI RM, MORGANTI L, SOUZA GO, FRANZOLIN MR, WUNDER EA JR, HEINEMANN MB, BARBOSA AS. Inactivation of the antimicrobial peptide LL-37 by pathogenic *Leptospira*. *Microb Patho*, 150, 104704, janeiro, 2021.

Microbial Pathogenesis 150 (2021) 104704



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micpath](http://www.elsevier.com/locate/micpath)



## Inactivation of the antimicrobial peptide LL-37 by pathogenic *Leptospira*

Priscila N. Oliveira <sup>a,b</sup>, Daniella S. Courrol <sup>a</sup>, Rosa Maria Chura-Chambi <sup>c</sup>, Ligia Morganti <sup>c</sup>, Gisele O. Souza <sup>b</sup>, Marcia R. Franzolin <sup>a</sup>, Elsie A. Wunder Jr. <sup>d,e</sup>, Marcos B. Heinemann <sup>b</sup>, Angela S. Barbosa <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN-CNEN/SP, Centro de Biotecnologia, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, New Haven, CT, USA

<sup>e</sup> Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador, Bahia, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Leptospira*



LL-37

Proteolytic inactivation

### ABSTRACT

*Leptospira* are aerobic, Gram-negative spirochetes with a high invasive capacity. Pathogenic *leptospira* secrete proteases that inactivate a variety of host's proteins including molecules of the extracellular matrix and of the human complement system. This strategy, used by several pathogens of medical importance, contributes to bacterial invasion and immune evasion. In the current work we present evidence that *Leptospira* proteases also target human cathelicidin (LL-37), an antimicrobial peptide that plays an important role in the innate immune response. By using six *Leptospira* strains, four pathogenic and two saprophytic, we demonstrated that proteases present in the supernatants of pathogenic strains were capable of degrading LL-37 in a time-dependent manner, whereas proteolytic degradation was not observed with the supernatants of the two saprophytic strains. Inactivation of LL-37 was prevented by using the 1,10-phenanthroline inhibitor, thus suggesting the involvement of metalloproteinases in this process. In addition, the antibacterial activity of LL-37 against two *Leptospira* strains was evaluated. Compared to the saprophytic strain, a greater resistance of the pathogenic strain to the action of the peptide was observed. Our data suggest that the capacity to inactivate the host defense peptide LL-37 may be part of the virulence arsenal of pathogenic *Leptospira*, and we hypothesize that its inactivation by the bacteria may influence the outcome of the disease.

Anexo3.





Declaro, para os devidos fins, que

**Daniella dos Santos Courrol**

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos",  
realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 21 janeiro 2019  
(Declaração válida por 5 anos)

  
**Prof. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva**  
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos

  
**Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira**  
Diretor do ICB

Instituto de Ciências Biomédicas | USP  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 • Cidade Universitária "Armando Salles Oliveira" • Butantã – São Paulo – SP • CEP 05508-900





**Uso de animais  
para experimentação**



## **DECLARAÇÃO**

Declaramos para os devidos fins que

**Daniella dos Santos Courrol**

participou do Curso "Uso de Animais em Experimentação" com carga horária total de 10 horas, em formato ensino a distância, realizado pela Comissão de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 12 março 2018  
Comissão de Biotérios  
ICB USP

Declaração de participação do curso  
**Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB**



Declaramos para os devidos fins que

**Daniella dos Santos Courrol**

participou do Curso "Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB", realizado pela Comissão Interna de Biossegurança do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com carga horária total de 6 horas.

São Paulo, 30 de março de 2023  
Comissão Interna de Biossegurança  
ICB USP

Anexo 6.

# Ética Ensino Ética

## Pesquisa Ensino

### Ensino Pesquisa

#### Ética Pesquisa Ética

##### Ensino Pesquisa

###### Ética Ensino Ética

###### Pesquisa Ensino

###### Ensino Pesquisa

###### Ética Pesquisa Ética

Certificamos que

**Courrol DS, Silva LB, Chura-Chambi R, Morganti I, Isaac L, Barbosa AS**

Apresentou o trabalho "Functional Characterization of Pappalysin-1 Domain Protein from Leptospira interrogans: a Secreted Metalloprotease with a Broad-spectrum of Activity" na 21ª Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, **Ética em Pesquisa e Ensino**, realizada em São Paulo, Brasil, de 4 a 6 de dezembro de 2019.



Ética em  
Pesquisa e  
Ensino





XXI Reunião  
Científica  
Anual  
Dezembro 4 - 6 de 2019

Eliana Faquim de Lima Mauro  
Presidente da Comissão  
Organizadora

Sandra Cocuzzo Sampaio Vessoni  
Diretora do Centro de  
Desenvolvimento Científico

Anexo 7.


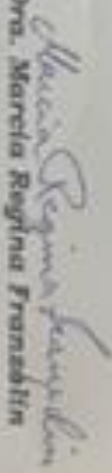
  
**LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA**  
 Avenida Dr. Vital Brazil, 1509  
 São Paulo - SP - CEP: 05582-900  
 Telefones: (55(11) 2627-9729 55(11) 2627-9826



**CERTIFICADO**

Certificamos que **DANIELLA DOS SANTOS COURROL** ministrou a palestra "Produção e caracterização da protease papainina de *Legionella interrogans*" no Ciclo de Seminários do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Tempo de duração: 1 hora.

São Paulo, 17 de junho de 2019

Dra. Josefa Bezerra da Silva   
 Dra. Marcia Regina Franklin 

Organizado(s) do Ciclo de Seminários  
 1º semestre 2019





Anexo 9.

