

DEMETRIA LUCI FAZOLO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE PROVÁVEIS LIPOPROTEÍNAS DE MEMBRANA
EXTERNA DE *LEPTOSPIRA* COM PROTEÍNAS DO HOSPEDEIRO**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2014

RESUMO

FAZOLO, D. L. **Estudo da interação de prováveis lipoproteínas de membrana externa de *Leptospira* com proteínas do hospedeiro.** 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A leptospirose é uma zoonose mundial causada por bactérias espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que colonizam os túbulos renais de animais domésticos e silvestres e são liberadas ao ambiente externo pela urina. A transmissão ocorre por meio de contato com água, alimentos e solo contaminados com urina, principalmente de roedores. Os mecanismos pelos quais as leptospirosas colonizam o organismo e causam a doença não são bem compreendidos. A identificação de proteínas capazes de mediar às interações com o hospedeiro durante a infecção é essencial para o entendimento da patogênese da leptospirose e no desenvolvimento de ensaios diagnósticos e vacinas mais eficientes. O objetivo deste trabalho foi estudar a interação de seis prováveis lipoproteínas de membrana externa de leptospira com as proteínas do hospedeiro: colágeno I, colágeno IV, elastina, fibrinogênio, fibronectina celular, fibronectina plasmática, laminina e plasminogênio. As proteínas recombinantes expressas na fração solúvel (Lp25, Lp21 e Lp22) e na fração insolúvel (Lp11, Lp35 e Lsa30), obtidas de lisados totais induzidos de *E. coli*, foram purificadas por cromatografia utilizando-se resina de afinidade à níquel e posteriormente analisadas por gel SDS-PAGE. O ensaio de interação das proteínas recombinantes com as proteínas de hospedeiro e o ensaio de especificidade e curva dose-resposta foram realizados por ELISA. O DNA genômico de algumas espécies de leptospirosas patogênicas e uma não patogênica foi isolado e digerido com a enzima de restrição *EcoRV*, posteriormente através do *Southern blot*, foi realizado um estudo de conservação gênica. Cada proteína recombinante purificada apresentou uma banda majoritária com peso molecular esperado. Foram obtidos altos títulos de anticorpos policlonais produzidos em camundongos Balb/c. Os experimentos de adesão demonstraram que as proteínas recombinantes apresentaram maior interação com os componentes do hospedeiro de maneira dose-dependente foram Lp21, Lp22 e Lsa30. Estas proteínas aderiram a fibronectina plasmática e laminina, além desses componentes, a Lp21 e a Lp22 interagiram com plasminogênio, a Lp22 e a Lsa30 interagiram com colágeno tipo IV. A Lp22 aderiu também à elastina e ao fibrinogênio. Os genes que codificam as prováveis lipoproteínas em estudo foram encontrados somente nas *Leptospiras* patogênicas. Em conjunto, estes resultados demonstraram que estas proteínas devem contribuir na adesão aos tecidos do hospedeiro, que constitui o evento inicial e essencial na patogênese da *Leptospira*. E, também poderiam ser candidatas a antígenos vacinais, uma vez que estão presentes nos sorovares da espécie *L. interrogans*, que é a mais prevalente causadora da leptospirose humana.

Palavras-chave: Leptospirose. *Leptospira*. Lipoproteínas. Adesinas.

ABSTRACT

FAZOLO, D. L. **Study of the interaction of probable outer membrane lipoprotein of *Leptospira* with host proteins.** 2014. 79 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira* that colonize the renal tubules of wild and domestic animals and are excreted in the environment by their urine. The transmission occurs through contact with water, food and soil contaminated with urine, mainly from rodents. The mechanisms by which leptospire colonize the host and cause the disease are not fully understood. The identification of proteins that mediate interactions with the host during infection is essential for the understanding of the pathogenesis of leptospirosis and the development of efficient diagnostic tests and vaccines. The aim of this work was to study the interaction of six leptospiral probable outer-membrane lipoproteins with host proteins: collagen I, collagen IV, elastin, fibrinogen, cellular fibronectin, plasma fibronectin, laminin, and plasminogen. The recombinant proteins were expressed in the soluble fraction (Lp25, Lp21 and Lp22) and insoluble fraction (Lp11, Lsa30 and Lp35) obtained from total lysates of induced *E. coli*, they were purified by nickel affinity chromatography, and subsequently analyzed by SDS-PAGE. The binding assay and dose-response curves with recombinant and host proteins were performed by ELISA. Genomic DNA from some species of pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* were isolated and digested with the restriction enzyme *EcoRV*, and the gene conservation study were performed by *southern blot*. Each purified recombinant protein showed a majority band with expected molecular weight. The high titers of polyclonal antibodies against recombinant proteins were produced in Balb/c mice. The binding experiments demonstrated that the recombinant proteins showed interaction with host components in a dose-dependent manner were Lp21, Lsa30 and Lp22. These proteins adhered to plasma fibronectin and laminin, in addition to these components, Lp21 and Lp22 interacted with plasminogen, Lp22 and Lsa30 interacted with collagen IV. The Lp22 also adhered to elastin and fibrinogen. The genes encoding the probable lipoproteins were found only in pathogenic *Leptospira*. These results demonstrated that these proteins may contribute in the adhesion to host tissues, which constitutes the essential initial event in the pathogenesis of *Leptospira*. Moreover, these proteins may also be candidates for vaccine antigens since they are present in the *L. interrogans* serovars, which are the most prevalent cause of human leptospirosis.

Keywords: Leptospirosis. *Leptospira*. Lipoproteins. Adhesins.

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma das principais zoonoses do mundo, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. As leptospiras colonizam os túbulos renais proximais de animais reservatórios e são eliminadas no ambiente externo pela urina, muitas vezes, durante toda a vida do animal. Esta doença acomete espécies silvestres, animais domésticos e o homem (VINETZ, 2001). A transmissão ocorre por meio de contato com água, alimentos e solo contaminados com urina infectada (BHARTI et al., 2003; FARR, 1995). A inalação de aerossóis e o contato direto com urina, tecidos e fluidos corporais provenientes de animais portadores também podem resultar em infecção (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Os casos de leptospirose humana apresentam uma ampla distribuição geográfica. O sudeste da Ásia, Oceania, Índia, Caribe e América Latina são consideradas regiões endêmicas. Nestas áreas, as frequentes inundações, as precárias condições das moradias e a alta infestação por roedores infectados são fatores que propiciam a disseminação e persistência de leptospiras no ambiente. Estima-se que a incidência anual, nestas localidades, é de 10 a 100 casos por 100.000 habitantes (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; HARTSKEERL, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). No Brasil, a leptospirose é considerada um importante problema de saúde pública, devido à sua distribuição endêmica com incidência média anual de aproximadamente 2 casos por 100.000 habitantes, durante todo o ano. E também, devido à ocorrência de epidemias em comunidades carentes de áreas urbanas sujeitas aos alagamentos, surtos em áreas rurais como em plantações de arroz e alto número de casos notificados após desastres naturais, como as inundações no Acre, em 2006 (470 casos) e, em Santa Catarina, em 2008 (496 casos) (BRASIL, 2009).

Na pecuária, a leptospirose tem causado grandes perdas econômicas, principalmente em função de alterações reprodutivas nos animais infectados. A leptospirose bovina é endêmica no Brasil, causa infertilidade, mastites, abortos, natimortalidade e decréscimo na produção de leite e de carne. Nos suínos, esta zoonose é responsável por repetição do cio, morte embrionária e baixo número de nascimentos (FAINE et al., 1999).

As leptospiras são bactérias espiraladas, móveis e variam de 0,1 a 0,2 µm de diâmetro por 6 a 25 µm de comprimento (FAINE et al, 1999). Diferenciam-se das outras espiroquetas por possuírem a célula terminada em gancho e dois flagelos periplasmáticos. A membrana dupla é uma estrutura típica, em que a membrana citoplasmática e o peptidoglicano da parede celular estão associados e cobertos por uma membrana externa. No

exterior o LPS (lipopolissacarídeo) é estruturalmente e imunologicamente semelhante ao LPS de organismos

Gram-negativos. No entanto, é relativamente atóxico para as células de animais, sendo menos letal em ratos, quando comparado com LPS de *E. coli* (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). São bactérias aeróbias obrigatórias, com uma temperatura ótima de cultivo entre 28 a 30 °C e utilizam ácidos graxos como única fonte de carbono que são metabolizados por β -oxidação (LEVETT, 2001). São as únicas espiroquetas que sobrevivem fora de hospedeiros, em solo úmido ou na água, que tenham pH neutro ou levemente alcalino.

Atualmente, o gênero *Leptospira* é dividido em 19 espécies, definidas por homologia de DNA e sequenciamento de genes, normalmente, o 16S rDNA (RAMADASS et al., 1992; WOO et al., 1997). Destas, nove espécies são consideradas patogênicas: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. kirschneri*, *L. alexanderi*, *L. genospecies 1* e *L. wolffii*. Seis são saprófitas: *L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. genospecies 3, 4 e 5*. Há, ainda, um grupo intermediário com quatro espécies, a *L. inadai*, *L. fainei*, *L. broomii* e *L. licerasiae* cuja patogenicidade ainda não foi confirmada (BRENNER et al., 1999; FAINE et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; YASUDA et al., 1987). As leptospiros também são subdivididas em sorovares definidos por soroadglutinação e posterior absorção cruzada com antígenos homólogos. São descritos mais de 250 sorovares distribuídos em 24 sorogrupos (BHARTI et al., 2003; VINETZ, 2001). Esta variedade antigênica se deve à heterogeneidade da estrutura na composição do LPS. A classificação em sorovar é amplamente utilizada devido à sua importância epidemiológica e clínica, embora, não se correlacione com a classificação taxonômica (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; LEVETT, 2001).

Cada sorovar está, geralmente, adaptado a uma espécie particular de hospedeiro, conhecido como hospedeiro de manutenção (reservatório), como a *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo e a *L. interrogans* sorovar Hardjo em bovinos, a *L. interrogans* sorovar Canicola em cães, a *L. interrogans* sorovar Pomona em suínos, e *L. interrogans* sorovar Copenhageni em ratos, entre outros. Nestes, a doença manifesta-se de maneira subclínica e crônica com eliminação de leptospiros através da urina (leptospiúria) durante longo período ou por toda a vida, tornando-os a principal fonte de contaminação ambiental para as outras espécies animais, denominadas hospedeiros acidentais, que desenvolvem a forma clínica da doença e apresentam leptospiúria intermitente e de curta duração (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Em áreas urbanas, os principais reservatórios de leptospiros são os roedores sinantrópicos das espécies *Rattus norvegicus* (rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato de telhado) e *Mus musculus* (camundongo). Os seres humanos são hospedeiros acidentais e a transmissão entre pessoas é rara podendo ocorrer pela via transplacentária, por ingestão de leite materno, ou ainda, por contato sexual. (PULIYATH; SINGH, 2012). *L. interrogans* prevalece como a espécie que mais causa leptospirose em seres humanos em todo o mundo (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001).

As espécies patogênicas de *Leptospira* penetram na pele e nas membranas mucosas e disseminam-se rapidamente, logo após a infecção, para outros tecidos e também são capazes de se translocarem entre as células (XUE; YAN; PICARDEAU, 2009). Entretanto, estas espiroquetas, raramente, são observadas no interior das células hospedeiras (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

As manifestações clínicas da leptospirose podem variar desde quadros assintomáticos e subclínicos (doença febril anictérica – 80 a 90% dos casos) até formas potencialmente fatais (doença grave - 5 a 10% dos casos) (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; PLANK; DEAN, 2000).

Na leptospirose grave, podem ocorrer dois quadros distintos: (i) a doença de Weil, caracterizada por icterícia, disfunção renal e hemorragia com taxa de mortalidade entre 5 a 15% e (ii) a síndrome pulmonar hemorrágica com insuficiência respiratória com fatalidade superior a 50% (MCBRIDE et al., 2005). As manifestações pulmonares relacionadas à leptospirose grave incluem tosse, dispneia, síndrome da angústia respiratória do adulto, hemoptise e hemorragia. Nestes casos, o paciente necessita receber tratamento médico especializado com internação em unidade de terapia intensiva por longo período, muitas vezes, sendo submetido à hemodiálise e/ou ventilação mecânica (ANDRADE; CLETO; SEGURO, 2007).

A forma anictérica, geralmente, ocorre em duas fases distintas. Na fase aguda ou septicêmica, o paciente apresenta febre alta, dores de cabeça, mialgias; sintomas semelhantes aos de outras doenças, como febre amarela, dengue e malária. A seguir, ocorre um período com aparente melhora do paciente. Posteriormente, a fase imune inicia-se com o retorno do estado febril, produção de anticorpos aglutinantes e eliminação de leptospiros pela urina. A forma grave da leptospirose apresenta-se monofásica aguda progressiva ou de curso prolongado, raramente é bifásica (LEVETT, 2001; VINETZ, 2001). Em mulheres gestantes, a leptospirose pode ser responsável pela icterícia neonatal, isquemia placentária, placentite, abortos espontâneos, hemorragias, insuficiência hepatorenal no feto ou alterações no seu

desenvolvimento. O feto pode estar em risco, mesmo nos casos de infecção assintomática materna, especialmente no primeiro e segundo trimestre, pelo fato do sistema imune adaptativo fetal ser ineficaz (PULIYATH; SINGH, 2012).

O diagnóstico clínico da doença não é fácil, devido à variedade de sintomas e ao fato de serem semelhantes aos de outras doenças, como febre amarela, dengue, malária, hepatite e gripe. Pode ser confirmado por meio de testes sorológicos como a aglutinação microscópica (MAT), que é a técnica de referência indicada pela Organização Mundial da Saúde para leptospirose humana ou animal. O MAT é realizado com suspensões de leptospiras vivas como antígeno e detecta a presença de anticorpos contra a bactéria no sangue do paciente. Por exigir duas amostras de soro, uma na fase inicial e outra na fase intermediária, o MAT demora até duas semanas para confirmar o diagnóstico clínico da doença. O diagnóstico errado pode levar a progressão para formas mais graves (LEVETT, 2001 e 2003).

O controle da doença envolve a eliminação de roedores e a melhoria das condições higiênico-sanitárias da população, medidas difíceis na prática, o que têm contribuído para um aumento da incidência da leptospirose em países tropicais e reforçam a necessidade de desenvolvimento de uma vacina eficiente (LEVETT, 2003).

As vacinas comerciais disponíveis até o momento consistem em preparações de culturas de leptospiras de diferentes sorovares de *L. interrogans* inativadas pela ação do calor e/ou formol. São amplamente usadas na pecuária e licenciadas para uso humano somente em Cuba, Rússia e China. Todas apresentam baixa eficiência, pois promovem proteção apenas contra os sorovares presentes na preparação e falham em induzir imunidade em longo prazo, o que requer administração anual ou semestral (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999). Além disso, contêm uma série de contaminantes oriundos do processo de obtenção, como componentes do meio e lipopolissacarídeos, que têm sido associados aos efeitos adversos observados (LEVETT, 2001). Como alternativa, tem sido proposto o desenvolvimento de uma vacina polivalente com o emprego de proteínas de membrana de leptospiras, que além de estarem envolvidas na interação das bactérias com as células do hospedeiro, são bastante conservadas entre as diferentes espécies e sorovares (BRANGER et al., 2001; HAAKE et al., 1999; SILVA et al., 2007).

Apesar do grande avanço científico, na última década, com o advento dos sequenciamentos genômicos, os mecanismos pelos quais as leptospiras colonizam o organismo e causam a doença não são bem compreendidos. A identificação de proteínas capazes de mediar às interações com o hospedeiro durante a infecção é essencial para o

entendimento da patogênese da leptospirose e no desenvolvimento de ensaios diagnósticos e vacinas mais eficientes. Dados experimentais têm mostrado que a patogenia pode estar relacionada com a capacidade destas bactérias em aderir a proteínas de matriz extracelular (ATZINGEN et al., 2008; BARBOSA et al., 2006; MERIEN et al., 2000), de escapar dos mecanismos de defesa apresentados pelo hospedeiro, como o sistema fagocitário e o complemento (BARBOSA et al., 2009; BARBOSA et al., 2010; CINCO; BANFI, 1983; CINCO et al., 2002; VERMA et al., 2006) e de produzir toxinas (DOLHNIKOFF et al., 2007).

A adesão de patógenos aos tecidos do hospedeiro é o evento inicial e essencial na patogênese da maioria das infecções e também importante na colonização e invasão do organismo do hospedeiro, sendo considerado um dos fatores de virulência (BOYLE; FINLAY, 2003; PATTI et al., 1994). Muitos grupos se dedicam a estudar a capacidade das bactérias em aderirem às células do hospedeiro, através de estruturas específicas, chamadas adesinas, que são responsáveis pela fixação, pelo tropismo da bactéria aos tecidos e pela interação aos receptores de células e tecidos do hospedeiro. Estes estudos podem contribuir no desenvolvimento de tratamentos de infecções bacterianas baseado na terapia antiadesão (OFEK; HASTY; DOYLE, 2003).

O processo de adesão depende de energia, pois bactérias patogênicas são carregadas negativamente e encontradas no meio fisiológico, da mesma forma, substratos celulares e tecidos de animais possuem características superficiais negativas. Esse evento ocorre através de ligações hidrofóbicas e interações não hidrofóbicas. As ligações hidrofóbicas são inespecíficas, fracas e reversíveis, que provavelmente são realizadas pela superfície bacteriana de modo a superar a repulsão das cargas, aproximando o patógeno da superfície da célula hospedeira. Consequentemente são realizadas as interações não hidrofóbicas, específicas, fortes e pouco reversíveis (OFEK; HASTY; DOYLE, 2003).

Algumas bactérias patogênicas possuem a capacidade de aderir às moléculas de adesão celular (CAMs). CAMs são receptores de superfície de células eucarióticas que medeiam as interações célula-célula e célula-matriz extracelular. Geralmente, são classificados em quatro grupos: integrinas, caderinas, membros da superfamília das imunoglobulinas de CAMs (IgCAMs) e selectinas. As bactérias ligam-se às CAMs imitando ou atuando no lugar de receptores da célula hospedeira ou seus ligantes (BOYLE; FINLAY, 2003). Recentemente, foi observado experimentalmente que as leptospirosas podem aderir aos receptores de células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos, a VE-caderina, resultando

em danos vasculares facilitando, dessa maneira, a evasão do patógeno da corrente sanguínea para diferentes tecidos durante a infecção (EVANGELISTA et al., 2014).

Além disso, a interação também pode envolver proteínas bacterianas que se ligam aos componentes de matriz extracelular como colágeno, elastina, fibrinogênio, laminina, sendo assim de elevada afinidade e especificidade, pois é uma ligação intermolecular (interação proteína-proteína). Essas proteínas podem ser expressas na superfície da membrana e são conhecidas pela abreviação MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (CHAGNOT et al., 2012; OFEK; HASTY; DOYLE, 2003; PATTI et al., 1994). Adicionalmente, alguns microrganismos podem secretar proteases que são capazes de degradar os componentes da matriz extracelular, resultando em um aumento dos danos nos tecidos durante a infecção. Esses componentes da matriz extracelular, parcialmente, degradados são alvos atrativos para a adesão de patógenos, através das adesinas expostas na superfície microbiana (SINGH et al., 2012).

A matriz extracelular é um tecido biologicamente ativo composto por uma mistura complexa de macromoléculas com interações específicas entre os diferentes componentes. Estruturalmente, está dividida em membrana basal, matriz conectiva e matriz sanguínea. Esta organização é formada por proteínas secretadas e glicoproteínas, que interagem tridimensionalmente, originando uma rede molecular desempenhando funções celulares, como a diferenciação e a expressão de genes específicos para cada tecido. Presente em eventos celulares como adesão, migração, proliferação, diferenciação celular e apoptose e angiogênese pela interação entre as moléculas da matriz extracelular e receptores da superfície celular, fatores de crescimento e citocinas específicas. Nessa interação, moléculas como proteoglicanos, glicosaminoglicanos, proteases e glicosidases, como heparanase, desencadeiam processos de sinalização celular (SOUZA; PINHAL, 2011).

O colágeno é o principal componente da matriz extracelular dos tecidos animais, constituindo 25% da massa total de proteína nos mamíferos. É constituído por proteínas fibrosas ricas em glicina e prolina, formadas por três cadeias polipeptídicas alongadas enroladas umas sobre as outras. No colágeno tipo I, as moléculas protéicas alongadas se associam paralelamente formando fibrilas e estas se agrupam compondo uma fibra e o processo de polimerização se acentua constituindo feixes de fibras, chamados de fibras de colágeno do tecido conjuntivo. O colágeno tipo I representa 90% do colágeno do corpo, distribuído na derme, tendões, ossos, órgãos internos, córnea e pigmentos (fibras de colágeno) e sua função é resistir às tensões. No colágeno tipo IV, essas triplas hélices se associam pelas extremidades formando uma rede. Este tipo de colágeno é encontrado na lamina basal e

possui funções de suporte, barreira e filtração (ALBERTS et al., 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

A elastina é uma glicoproteína altamente hidrofóbica e suas moléculas formam uma rede elástica composta por fibras mais finas que o colágeno e apresentando ligações cruzadas entre si, proporcionando a elasticidade da pele, vasos sanguíneos e pulmões (ALBERTS et al., 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

O fibrinogênio é uma glicoproteína composta por seis polipeptídeos, é encontrada em altas concentrações no plasma sanguíneo e atua na cascata de coagulação e no processo de cicatrização de feridas, onde é clivada pela enzima trombina e convertida em fibrina, formando o coágulo (KREIS; VALE, 1999; PATTI et al., 1994).

A fibronectina é um mediador de grande variedade das interações celulares com a matriz extracelular e é diferenciada em duas formas: a solúvel que circula no sangue e em outros fluídos corporais, denominada fibronectina plasmática e a insolúvel, chamada fibronectina celular, uma glicoproteína alongada que realiza a adesão entre as células não epiteliais e a matriz extracelular (ALBERTS et al., 2008; CHAGNOT et al., 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; PANKOV; YAMADA, 2002).

A laminina é o principal componente da lamina basal, consiste em uma molécula formada por três polipeptídeos e é responsável pela adesão das células epiteliais à lâmina basal (ALBERTS et al., 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

O plasminogênio é uma proenzima que circula no plasma em grandes quantidades, onde é convertido em plasmina pela ação do ativador de plasminogênio tecidual, ativador de plasminogênio uroquinase, trombina, fibrina ou fator XII. A plasmina degrada o coágulo sanguíneo e vários componentes da matriz extracelular (ALBERTS et al., 2008; LAHTENMAKI; KUUSELA; KORHONEN, 2001).

Merien, Baranton e Perolat (1997) demonstraram que as bactérias da espécie *Leptospiras interrogans* foram capazes de invadir células Vero e a sua penetração ativa e capacidade de indução de apoptose de macrófagos estão correlacionadas com a virulência, assim como a interação de moléculas alvo de superfície celular de hospedeiros estão envolvidos na adesão.

Atualmente, tem sido observado experimentalmente que *Leptospiras* spp patogênicas podem aderir a uma grande variedade de proteínas do hospedeiro como colágeno, elastina, fibronectina, fibrinogênio, laminina e plasminogênio. É possível que estas bactérias expressem adesinas em diferentes estágios da infecção, como durante a adesão, disseminação ou colonização. Foi mostrado que algumas proteínas, como a LigA/B (CHOY et al., 2007;

LIN; CHANG, 2007; LIN et al., 2009), LipL32 (HAUK et al., 2008; HOKE et al., 2008), LipL53 (OLIVEIRA et al., 2010), Lp95 (AZTINGEN et al., 2009), Lsa21 (AZTINGEN et al., 2008), Lsa24 (BARBOSA et al., 2006), Lsa25 e Lsa33 (DOMINGOS et al., 2012), Lsa27 (LONGHI et al., 2009), Lsa30 (SOUZA et al., 2012), Lsa63 (VIEIRA et al., 2010a), Lsa66 (OLIVEIRA et al., 2011), Len de B a F (STEVENSON et al., 2007), OmpL37 (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010), TlyC (CARVALHO et al., 2009) apresentam capacidade de aderir a proteínas do hospedeiro *in vitro*. Muitas destas proteínas são prováveis lipoproteínas identificadas no genoma de *Leptospira* spp.

Lipoproteínas bacterianas constituem um grupo de proteínas de membrana que possuem a cisteína aminoterminal covalentemente ligada a ácidos graxos. Este tipo de modificação pós-tradução foi descoberto, em 1973, por Hantke e Braun, no estudo da principal lipoproteína presente na membrana externa de *E. coli* (lipoproteína ligante a mureína). Posteriormente, várias outras lipoproteínas bacterianas foram identificadas e caracterizadas como proteínas estruturais, enzimas, receptores, transportadores, adesinas, toxinas e com funções relacionadas a virulência (BABU; SANKARAN, 2002; SETUBAL et al., 2006; SUTCLIFFE; HARRINGTON, 2004).

Em bactérias, as lipoproteínas são sintetizadas com um peptídeo sinal que é clivado por uma peptidase sinal (Lsp) antes da ligação covalente aos ácidos graxos, normalmente palmitato (HAYASHI; WY, 1990). Análise das sequências dos peptídeos sinais de várias lipoproteínas bem caracterizadas de *E. coli* e outras bactérias gram-negativas revelaram que o sítio de clivagem da Lsp ocorre depois da cisteína e corresponde a sequência consenso: [L, V, I]-3 [A, S, T, G]-2 [G,A]-1C+1, localizada na região carboxiterminal do peptídeo sinal, chamada lipobox (SANKARAN; WU, 1993; VON HEIJNE, 1989).

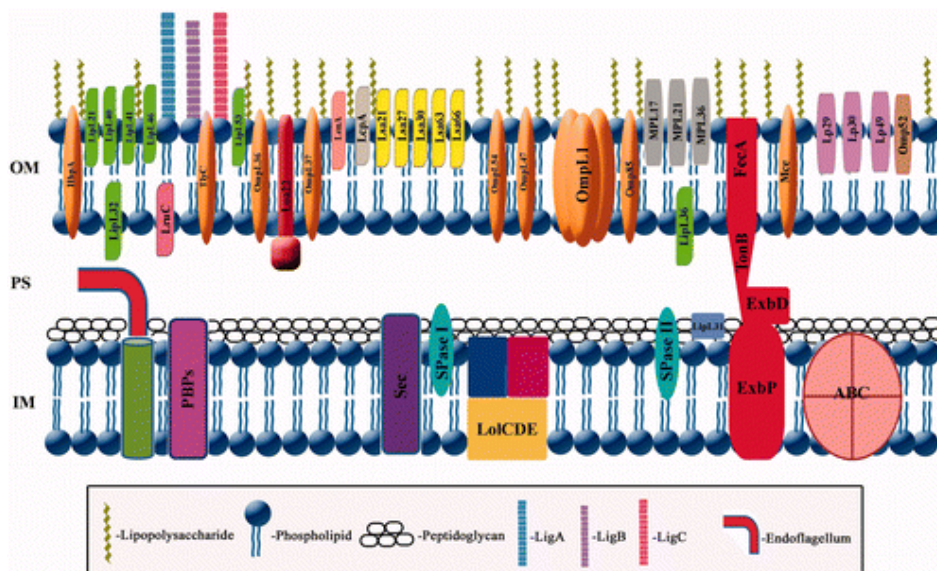
Estudos posteriores mostraram que lipoproteínas de espiroquetas com sítios de clivagem da Lsp com sequências diferentes das descritas eram lipidadas. As sequências de 26 lipoproteínas de espécies de *Leptospira*, *Treponema*, *Borrelia* e *Brachyspira* com evidências experimentais de lipidação foram usadas para definir um novo lipobox característico de espiroquetas: [L, A, S]-4 [L, V, F, I]-3 [I, V, G]-2 [A, S, G]-1 C+1 (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004; HAAKE, 2000; SETUBAL et al., 2006). A análise das sequências dos genomas de seis espécies de espiroquetas utilizando o lipobox divergente revelou um número maior de prováveis lipoproteínas do que a predição feita anteriormente com a sequência lipobox padrão (SETUBAL et al., 2006). Para a *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni foram identificadas 157 lipoproteínas utilizando lipobox de espiroquetas e apenas 47 foram preditas com sequência típica (NASCIMENTO et al., 2004a; SETUBAL et al., 2006). Esta

diversidade sugere que muitas funções celulares podem ser dependentes das lipoproteínas, como formação e estabilização da parede celular, transporte de substratos, interação bactéria-hospedeiro, virulência entre outras.

O processamento das lipoproteínas bacterianas ocorre no espaço periplasmático, depois da translocação da proteína para a membrana citoplasmática, através da maquinaria de secreção conhecida como Sec, envolvendo diversos componentes inicialmente descritos para *E. coli*. Como proteínas homólogas às envolvidas na secreção e no processamento das lipoproteínas já foram identificadas nos genomas de *B. burgdorfi* (FRASER et al., 1997), *T. pallidum* (FRASER et al., 1998) e *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004a,b), acredita-se que o processo de biossíntese de lipoproteínas seja semelhante nas espiroquetas.

As lipoproteínas associam-se com as membranas da bactéria através de interações hidrofóbicas entre a porção lipídica e a membrana, podendo estar localizadas na face periplasmática da membrana citoplasmática, no folheto interno da membrana externa ou no folheto externo da membrana externa (Figura 1) (SEYDEL; GOUNON; PUGSLEY, 1999; YAMAGUCHI; YU; INOUE, 1988).

Figura 1 - Membrana externa de *Leptospira* spp.



Extraído: Raja; Natarajaseenivasan, 2013

Recentemente, em trabalho desenvolvido por nosso grupo, seis genes que codificam prováveis lipoproteínas associadas à membrana externa foram selecionados, através de análise *in silico*, a partir do banco de dados de lipoproteínas construído por Setubal et al. (2006). São

proteínas hipotéticas, que ainda não foram identificadas em nenhum outro organismo e não possuem função conhecida. As sequências maduras (sem peptídeo sinal) desses genes foram clonadas em vetor de expressão em *E. coli*, que permite a fusão das proteínas recombinantes com uma cauda de histidina (BARBOSA et al., 2010). As proteínas recombinantes purificadas foram obtidas e utilizadas como modelo de antígeno no desenvolvimento de uma vacina contra a leptospirose. Hamsters imunizados com *pool* destas proteínas, acrescido de flagelina ou hidróxido de alumínio como adjuvantes, foram parcialmente protegidos do desafio letal (MONARIS, 2011).

Entretanto, não está claro, o quanto cada proteína contribui na interação da leptospira com os tecidos do hospedeiro. Somente as proteínas Lsa24 (BARBOSA et al., 2006), LigA/B (CHOY et al., 2007) e Lsa63 (VIEIRA et al., 2010a) foram testadas quanto à sua capacidade de inibir a adesão das bactérias às proteínas de matriz extracelular, utilizando soro policlonal obtido contra as formas recombinantes destas proteínas. Nestes experimentos, somente inibição parcial foi observada, sugerindo que outras adesinas devam existir em espécies patogênicas de *Leptospira* spp.

Neste trabalho, foi realizado o estudo da interação destas seis prováveis lipoproteínas de membrana externa de leptospira com diferentes proteínas do hospedeiro.

6 CONCLUSÃO

As proteínas recombinantes que apresentaram maior interação com os componentes de matriz extracelular de maneira dose-dependente foram Lp21 (LIC10507), Lp22 (LIC10704) e Lsa30 (LIC11087). Estas proteínas aderiram a fibronectina plasmática e laminina. Além desses componentes, a Lp21 e a Lp22 interagiram com plasminogênio, a Lp22 e a Lsa30 interagiram com colágeno tipo IV. A Lp22 aderiu também à elastina e ao fibrinogênio.

Portanto, as proteínas recombinantes Lp21, Lp22 e a Lsa30 devem contribuir na adesão das leptospiras aos tecidos do hospedeiro. Conforme foi observado nos experimentos de adesão essas proteínas apresentaram forte ligação com proteínas do hospedeiro que estão relacionadas ao mecanismo de coagulação, como o fibrinogênio, a fibronectina plasmática e o plasminogênio, talvez por esta razão, possam estar envolvidas também nos processos hemorrágicos. Além disso, houve a interação dessas também com o colágeno tipo IV, elastina e a laminina, deste modo, podem mediar as interações como adesão, disseminação e colonização das bactérias no organismo do hospedeiro.

Os resultados obtidos com o estudo de conservação gênica demonstraram que estas proteínas também poderiam ser candidatas a antígenos vacinais, uma vez que estão presentes nos sorovares da espécie *L. interrogans*, que é a mais prevalente causadora da leptospirose humana.

REFERÊNCIAS*

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 5th ed. New York: Garland Science, 2008. 1268 p.
- ANDRADE, L.; CLETO, S.; SEGURO, A. C. Door-to-dialysis time and daily hemodialysis in patients with leptospirosis: impact on mortality. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN**, v. 2, n. 4, p. 739-744, 2007.
- ATZINGEN, M. V.; BARBOSA, A. S.; DE BRITO, T.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; LIMA, D. M.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 70, p. 1471-2180, 2008.
- ATZINGEN, M. V.; GOMEZ, R. M.; SCHATTNER, M.; PRETRE, G.; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. **Journal of Infection**, v. 59, p. 264-276, 2009.
- ATZINGEN, M. V.; VIEIRA, M. L.; OLIVEIRA, R.; DOMINGOS, R. F.; MENDES, R. S.; BARROS, A. T.; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Evaluation of Immunoprotective Activity of Six Leptospiral Proteins in the Hamster Model of Leptospirosis. **The Open Microbiology Journal**, v. 6, p. 79-87, 2012.
- BABU, M. M.; SANKARAN, K. DOLOP: database of bacterial lipoprotein. **Bioinformatics**, v. 18, p. 641-643, 2002.
- BALLARD S. A.; WILLIAMSON M.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. Interactions of virulent and avirulent leptospire with primary cultures of renal epithelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, v. 21, 59-67, 1986.
- BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; NEVES, F. O.; ATZINGEN, M. V.; WATANABE, M. M.; VIEIRA, M. L.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 6356-6364, 2006.
- BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; SILVA, A. S.; DAHA, M. R.; ISAAC, L. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 1137-1143, 2009.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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

BAROCCHI, M. A.; KO, A. I.; REIS, M. G.; MCDONALD, K. L.; RILEY, L. W. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6926-6932, 2002.

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

BOYLE, E. C.; FINLAY, B. B. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 633-639, 2003.

BRANGER, C.; SONRIER, C.; CHATRENET, B.; KLONJKOWSKI, B.; RUVOEN-CLOUET, N.; AUBERT, A.; ANDRÉ-FONTAINE, G.; ELOIT, M. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6831-6838, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia Leptospirose: Diagnóstico e manejo Clínico**. Brasil, 2009. 34 p.

BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGERS, F. C.; WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 839-858, 1999.

CARVALHO, E.; BARBOSA, A. S.; GOMEZ, R. M.; CIANCIARULLO, A. M.; HAUK, P.; ABREU, P. A.; FIORINI, L. C.; OLIVEIRA, M. L. S.; ROMERO, E. C.; GONÇALES, A. P.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; PAULO L. HO. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. **FEBS Letters**, v. 583, p. 1381-1385, 2009.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; FRAGA, T. R.; SILVA, L. B.; MONARIS, D.; ABREU, P. A. E.; STROBEL, S.; JÓZSI, M.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205 p. 995-1004, 2012.

CERQUEIRA, G. M.; MCBRIDE, A. J. A.; MATHIEU PICARDEAU, M.; RIBEIRO, S. G.; MOREIRA, A. N.; MOREL, V.; REIS, M. G.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A. Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (*lig*) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of *ligB* to typing leptospiral isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, 1173-1181, 2009.

CHAGNOT, C.; LISTRAT, A.; ASTRUC, T.; DESVAUX, M. Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 1687-1696, 2012.

CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L.; MOLLER, A. K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 2441-2450, 2007.

CINCO, M.; BANFI, E. Activation of complement by leptospires and its bactericidal activity. **International journal of microbiology and hygiene. A, Medical microbiology, infectiousdiseases, parasitology**, v. 254, p. 261-265, 1983.

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

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

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

DOMINGOS, R. F.; VIEIRA, M. L.; ROMERO, E. C.; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 50, p. 1471-2180, 2012.

EVANGELISTA, K.; FRANCO, R.; SCHWAB A.; COBURN J. *Leptospira interrogans* binds to Cadherins. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2672, 2014.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. ***Leptospira and leptospirosis***. 2nd ed. Melbourne: Australia, MediSci, 1999. 272 p.

FARR, R. W. Leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p.1-8, 1995.

FERNANDES, L. G. V.; VIEIRA, M. L.; KIRCHGATTER, K.; ALVES, I. J.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. T. O. OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 10, p. 3679-3692, 2012.

FIGUEIRA, C. P.; CRODA, J.; CHOY, H. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I.; 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 Microbiology**, v. 11, n. 129, p. 1471-2180, 2011.

FRASER, C. M. et al. Genomic sequence of Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. **Nature**, v. 390, p. 580-586, 1997.

FRASER, C. M. et al. Complete Genome Sequence of *Treponema pallidum*, the Syphilis Spirochete. **Science**, v. 281, p. 375-388, 1998.

GÓMEZ, R. M.; VIEIRA, M. L.; SCHATTNER, M.; MALAVER, E.; WATANABE, M. M.; BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A. E.; DE MORAIS, Z. M.; CIFUENTE, J. O.; ATZINGEN, M. V.; OLIVEIRA, T. R.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Putative outer membrane proteins of *Leptospira interrogans* stimulate human umbilical vein endothelial cells (HUVECS) and express during infection. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, p. 315-322, 2008.

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; REIS, M. G.; LEVETT, P. N.; KO, I. A.; HAAKE, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 4958-4968, 2001.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 12, p. 6572-6582, 1999.

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

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The Leptospiral major Outer Membrane Protein LipL32 is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the Leptospiral Outer Membrane and Description of Three Novel Leptospiral Membrane Proteins. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 4936-4945, 2002.

HANTKE, K.; BRAU, V. Covalent Binding of Lipid to Protein. Diglyceride and Amide-Linked Fatty Acid at the N-Terminal End of the Murein-Lipoprotein of the *Escherichia coli* Outer Membrane. **European Journal of Biochemistry**, v. 34, p. 284-296, 1973.

HARTSKEERL, R. A. Leptospirosis: current status and future trends. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 309, 2006.

HARTWIG, D. D.; SEIXAS, F. K.; CERQUEIRA, G. M.; MCBRIDE, A. J. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Characterization of the Immunogenic and Antigenic Potential of Putative Lipoproteins from *Leptospira interrogans*. **Current Microbiology**, v. 62, n. 4, p.1337-1341, 2011.

HAUK, P.; MACEDO, F.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M., BARBOSA, A. S.; HO, P. L. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 2642-2650, 2008.

HAYASHI, S.; WU, H. C. Lipoproteins in Bacteria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 3, p. 451-471, 1990.

HOKE, D. E.; EGAN, S.; CULLEN, P. A.; ADLER, B. LipL32 is an Extracellular Matrix-Interacting Protein of *Leptospira* and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 2063-2069, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 364 p.

KASSEGNE, K.; HU, W.; OJCIUS, D. M.; SUN, D.; GE, Y.; ZHAO, J.; X. FRANK YANG, X. F.; LI, L.; YAN, J. Identification of Collagenase as a Critical Virulence Factor for Invasiveness and Transmission of Pathogenic *Leptospira* Species. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, p. 1105-1115, 2014.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p.736-747, 2009.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, p. 1545-1552, 2004.

KOSITANONT, U.; CHOTINANTAKUL, K.; PHULSUKSOMBATI, D.; TRIBUDDHARAT, C. Assessment of Southern blot ribotyping for differentiation of *Leptospira* strains isolated from field rats. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 288-297, 2007.

KREIS, T.; VALE, R. **Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1999. 568 p.

LAHTEENMAK, K.; KUUSELA, P.; KORHONEN, T. K. Bacterial plasminogen activators and receptors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 531-552, 2001.

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

LEVETT, P. N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 447-52, 2003.

LIN, Y. P.; CHANG, Y. F. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, p. 443-448, 2007.

LIN, Y. P.; LEE, D. W.; MCDONOUGH, S. P.; NICHOLSON, L. K.; SHARMA Y.; CHANG, Y. F. Repeated domains of *Leptospira* immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 19380-19391, 2009.

LIN, Y. P.; MCDONOUGH, S. P.; SHARMA, Y.; CHANG, Y. F. *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen α C domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1063-1076, 2011.

LONGHI, M. T.; OLIVEIRA, T. R.; ROMERO, E. C; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1275-1282, 2009.

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

MENDES, R. S.; ATZINGEN, M. V.; DE MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; SERRANO, S. M. T.; ASEGA, A. F.; ROMERO, E. C; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. The Novel Leptospiral Surface Adhesin Lsa20 Binds Laminin and Human Plasminogen and is Probably Expressed during Infection. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 11, p. 4657-4667, 2011.

MERIEN, F.; BARANTON, G. PEROLAT, P. Invasion of Vero Cells and Induction of Apoptosis in Macrophages by Pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 729-738, 1997.

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

MCBRIDE, A. J. A.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, p. 376-386, 2005.

MONARIS, D. **Avaliação do potencial adjuvante da flagelina FliC_i de *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium no desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose.** 2011. 110f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

MUIZNIEKS, L. D.; WEISS, A. S.; KEELEY, F. W. Structural disorder and dynamics of elastin. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 88, p. 239-250, 2010.

MURRAY, G. L. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. **Veterinary Microbiology**, v. 162, p. 305-314, 2013.

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

NASCIMENTO A. L., KO A. I., MARTINS E. A., MONTEIRO-VITORELLO C. B.; et al. Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164-2172, 2004b.

OFEK, I.; HASTY, D. L.; DOYLE, R. J. **Bacterial adhesion to animal cells and tissues**. Washington, D. C.: ASM Press, 2003. 416 p.

OLIVEIRA, T. R.; LONGHI, M. T.; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 207-217, 2010.

OLIVEIRA, R.; DE MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Characterization of novel OmpA-Like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21962, 2011.

PALANIAPPAN, R. U. M.; CHANG, P. Y. F.; JUSUF, S. S. D.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J. F.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; DIVERS, T. J.; SIMPSON, K.W.; MCDONOUGH, P. L.; MOHAMMED, H. O. Cloning and Molecular Characterization of an Immunogenic LigA Protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 5924-5930, 2002.

PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 3861-3863, 2002.

PATTI, J. M.; ALLEN, B. L.; MCGAVIN, M. J.; HOOK, M. MSCRAMM: Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, p. 585-617, 1994.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MEDIGUE, C.; ADLER, B. Genome Sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. e1607, 2008.

PINNE, M.; CHOY, H. A.; HAAKE, D. A. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, p. e815, 2010.

PINNE, M.; HAAKE, D. A. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies. **PLoS ONE**, v. 8, n.1, p. e51025, 2013.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp in humans. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 10, p. 1265-1276, 2000.

PULIYATH, G.; SINGH, S. Leptospirosis in pregnancy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 2491-2496, 2012.

RAMADASS, P.; JARVIS, B. D.; CORNER, R. J.; PENNY, D.; MARSHALL, R. B. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 215-219, 1992.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1103-1109, 2004.

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

SANKARAN, K.; WU, H. C. Bacterial lipoprotein. In: Schlesinger, M. J. (Ed.). **Lipid Modification of protein**. London: CRC Press, Boca Raton, 1993. p. 163-181.

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

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

SHANG, E. S.; SUMMERS, T. A.; HAAKE, D. A. Molecular Cloning and Sequence Analysis of the Gene Encoding LipL41, a Surface-Exposed Lipoprotein of Pathogenic *Leptospira* Species. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 2322-2330, 1996.

SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J. A.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G. R.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; MITERMAYER, G. R.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, p. 6277-6286, 2007.

SINGH, B.; FLEURY, C.; JALALVAND, F.; RIESBECK, K. Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 1122-1180, 2012.

SOUZA, R. S.; PINHAL, M. A. S. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 36, n. 1, p. 48-54, 2011.

SOUZA, N. M.; VIEIRA, M. L.; ALVES, I. J.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. **Microbial Pathogenesis**, v. 53, p. 125-134, 2012.

STVENSON, B.; CHOY, H. A.; PINNE, M.; ROTONDI, M. L.; MILLER, M. C.; DEMOLL, E.; KRAICZY, P.; COOLEY, A. E.; CREAMER, T. P.; SUCHARD, M. A.; BRISSETTE, C. A.; VERMA, A.; HAAKE, D. A. *Leptospira interrogans* Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. **PLoS ONE**, v. 2, n. 11, p. e1188, 2007.

SUTCLIFFE, I. C.; HARRINGTON, D. J. Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 645-659, 2004.

VERMA, A.; HELLWAGE, J.; ARTIUSHIN S.; ZIPFEL, P.F.; KRAICZY, P.; TIMONEY, J.F.; STEVENSON, B. LfhA, a novel factor H-binding proteins of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 5, p. 2659-2666, 2006.

VERMA, A.; BRISSETTE, C. A.; BOWMAN, A. A.; SHAH, S. T.; ZIPFEL, P. F.; STEVENSON, B. Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 2053-2059, 2010.

VIEIRA, M. L.; DE MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. **Journal of Infection**, v. 60, p. 52-64, 2010a.

VIEIRA, M. L.; ATZINGEN, M. V.; OLIVEIRA, T. R.; OLIVEIRA, R.; ANDRADE, D. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. *In Vitro* Identification of Novel Plasminogen-Binding Receptors of the Pathogen *Leptospira interrogans*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. e11259, 2010b.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, p. 527-538, 2001.

VON HEIJNE, G. The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. **Protein engineering**, v. 2, p. 531-534, 1989.

WEBER, M. Basement membrane proteins. **Kidney International**, v. 41, p. 620-628, 1992.

WOO, T. H. S.; PATEL, B. K. C.; SMYTHE, D. L.; SYMONDS, M. I.; NORRIS, M. A.; DOHNT, M. F. Comparison of two PCR methods for rapid identification of *Leptospira* genospecies *interrogans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 155, p. 169-177, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human Leptospirosis: **Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control**. Geneva, 2003. 110 p.

XUE, F.; YAN, J.; PICARDEAU, M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 328-333, 2009.

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

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F; ROGER, F; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 4, p. 407-415, 1987.