

**MÔNICA LARUCCI VIEIRA**

**INTERAÇÃO DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS* COM  
O SISTEMA PROTEOLÍTICO PLASMINOGÊNIO /  
PLASMINA: ANÁLISE, CARACTERIZAÇÃO E  
POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES NA INFECÇÃO**

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

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento

Versão original

São Paulo  
2012

## RESUMO

Vieira ML. Interação de *Leptospira interrogans* com o sistema proteolítico do plasminogênio/plasmina: análise, caracterização e possíveis implicações na infecção. 253 páginas. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, Brasil, 2012.

A leptospirose é uma importante zoonose, causada por bactérias espiroquetas do gênero *Leptospira*. No Brasil, a leptospirose representa um grave problema de saúde pública com surtos epidêmicos nas épocas de chuvas, além de acarretar grande impacto econômico na pecuária. Apesar da sua importância, os mecanismos moleculares da patogênese, virulência e processo infeccioso das leptospirosas permanecem não compreendidos. Recentemente, foram identificadas proteínas de leptospirosas com função de adesão aos componentes de matriz extracelular. Seguindo a adesão, as bactérias devem alcançar a corrente sanguínea para chegar aos tecidos e órgãos, e então colonizar sítios secundários de infecção e imunologicamente privilegiados, como os túbulos renais. A atividade proteolítica de degradação e desestruturação da matriz extracelular e membrana basal é crucial para essa etapa. No entanto, as leptospirosas, bem como a maioria dos micro-organismos patogênicos, não apresentam proteases conhecidas capazes de degradação dessas barreiras mecânicas. Como estratégia, muitos patógenos desenvolveram a capacidade de interagir com o sistema proteolítico do plasminogênio/plasmina dos hospedeiros, de modo que adquiram atividade proteolítica de degradação de matriz extracelular e membrana basal. Esse parece ser um mecanismo importante durante o processo de disseminação nos hospedeiros. Tendo isso em vista, propôs-se a investigação do mesmo sistema durante o processo infeccioso da leptospirose. Foi demonstrada pela primeira vez a interação de *Leptospira* com o sistema fibrinolítico via captura de plasminogênio na superfície e geração de plasmina por ativadores do hospedeiro. Foram identificadas diversas proteínas que podem atuar como receptores de plasminogênio em *Leptospira*, algumas aparentemente diferencialmente expressas em condição de virulência, o que sugere a importância desse mecanismo para a patogenicidade dessas bactérias. A plasmina associada à superfície bacteriana confere capacidade de degradação de componentes de matriz extracelular e maior habilidade de penetração por monocamadas de células endoteliais, o que pode favorecer a disseminação no hospedeiro. A plasmina ligada às leptospirosas beneficia a evasão do sistema imune inato, já que diminui a deposição de IgG e C3b, aumentando a

sobrevivência das bactérias ao ataque do sistema complemento. As leptospiros mostraram-se capazes de estimular o desbalanço na regulação de sistemas dependentes de proteases do hospedeiro, já que induzem a expressão de ativadores de plasminogênio e metaloproteases de matriz por células endoteliais. Além disso, pacientes com leptospirose confirmada exibem níveis mais elevados de ativadores de plasminogênio e metaloproteases de matriz circulantes no plasma, o que parece ser mais exacerbado no início da infecção. Os resultados obtidos são de grande contribuição para o conhecimento acerca dos aspectos moleculares do processo infeccioso das leptospiros. Nossos estudos descrevem uma nova atividade proteolítica que possivelmente é (representa) um dos mecanismos utilizados pelas leptospiros para facilitar a sua penetração, disseminação e evasão imune no hospedeiro.

**Palavras-chave:** *Leptospira*. Leptospirose. Plasminogênio. Plasmina. Metaloproteases de matriz. Patogenicidade bacteriana.

## ABSTRACT

Vieira ML. *Leptospira interrogans* interactions with the plasminogen/plasmin proteolytic system: analysis, characterization and possible implications for the infection. 253 pages. Doctoral thesis (Biotechnology). Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, Brazil, 2012.

Leptospirosis is a globally important zoonosis, caused by pathogenic bacteria belonging to the order Spirochaetales, genus *Leptospira*. Leptospirosis is a disease with great social and economic impact in public health and livestock in Brazil. Despite its importance, the molecular mechanisms for leptospiral pathogenesis, virulence, and infectious process remain poorly understood. Recently, several leptospiral proteins were characterized as extracellular matrix components ligands. After adhesion, the organism has to reach the blood circulation in order to colonize target organs, immunologically safe environments, such as the renal tubules. The proteolytic activity is crucial for this stage, as it allows the extracellular matrix and basal membrane disruption. However, as the majority of pathogenic microorganisms, *Leptospira* lack proteases capable of degrading the components of these structural barriers. In an attempt to overcome this absence, many pathogens evolved the ability to interact with the host's plasminogen/plasmin system in order to acquire proteolytic activity. This ability seems to be important for the pathogens' spreading process along the hosts' tissues. Those facts prompted the investigation of the same mechanism during the infectious process of leptospirosis. This work reports for the first time the *Leptospira* interaction with the fibrinolytic system by capturing plasminogen on the surface and generation of plasmin by the host's activators. Several plasminogen binding proteins that may act as receptors were identified in *Leptospira*, some of them apparently differentially expressed in highly virulent conditions, suggesting the importance of this mechanism for the leptospiral pathogenesis. The plasmin associated to the bacterial surface was capable to degrade extracellular matrix components, facilitating the penetration through endothelial cells that may enhance the dissemination within the host. The plasmin bound to the leptospirae contributes to the immune evasion, by decreasing IgG and C3b depositions, augmenting the bacterial survival upon complement system attack. Leptospirae were shown to stimulate an imbalance in the fibrinolytic and proteases systems regulation by increasing the expression of plasminogen activators and matrix metalloproteases by endothelial cells. Furthermore, confirmed leptospirosis patients

show higher levels of circulating plasminogen activators and matrix metalloproteases, which appears to be more pronounced at the beginning of the infection. Altogether, the results obtained contribute to the knowledge of the molecular aspects of leptospirosis infection. These studies reveal a novel proteolytic activity that represents one possible mechanism used by the leptospire to enhance penetration, dissemination and immune evasion within the hosts.

**Keywords:** *Leptospira*. Leptospirosis. Plasminogen. Plasmin. Matrix metalloproteases. Bacterial pathogenesis.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 BACTÉRIAS ESPIROQUETAS

As espiroquetas constituem um distinto grupo de bactérias helicoidais móveis, amplamente distribuídas na natureza, que vivem desde como formas livres no ambiente, como em associação com diversos grupos de eucariotos (Charon e Goldstein, 2002). Embora as associações com os hospedeiros sejam em sua maioria benignas, algumas espiroquetas são patogênicas para animais e humanos. Muitas espécies causam doenças altamente prevalentes e relevantes como a leptospirose (*Leptospira* spp.), sífilis (*Treponema pallidum pallidum*), doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi*) e periodontite (*Treponema denticola*).

O filo Spirochaetales contém uma única classe e ordem. Como grupo taxonômico, a ordem Spirochaetales foi definida com base nas características morfológicas únicas entre as bactérias que a compõem. Possuem corpo celular espiralado, envolto por membrana lipídica e parede celular de peptidoglicanos, também chamado de cilindro protoplasmático, correspondendo à estrutura típica de outras bactérias gram-negativas. O que as torna singulares é a presença de uma membrana de bicamada lipídica externa ao cilindro protoplasmático, definindo o periplasma, que contém o flagelo periplasmático, ou endoflagelo. Os endoflagelos podem variar em número e tamanho de acordo com a espiroqueta, ficando esses ancorados em uma das extremidades do corpo celular, estendendo-se até a extremidade oposta.

Embora as espiroquetas compartilhem características estruturais e morfológicas, constituem um grupo extremamente diversificado fisiologicamente. Variam desde anaeróbicas até aeróbicas de vida livre ou parasitas obrigatórios.

### 1.2 AS LEPTOSPIRAS

#### 1.2.1 Taxonomia e classificação das leptospiiras

As leptospiiras pertencem à família Leptospiraceae, composta pelos gêneros *Leptospira* spp., *Turneria* spp. e *Leptonema* spp. (Haake et al., 2002). O gênero *Leptospira* é composto por espécies saprofíticas de vida livre e espécies patogênicas, sendo estas últimas parasitas obrigatórias ou transientes. Há duas formas de classificação de *Leptospira* spp.: uma

molecular, fundamentada em análises gênicas, e outra sorológica, baseada em determinantes antigênicos. Ambas reconhecem espécies patogênicas e saprofitas.

A sorologia foi o método utilizado para a classificação das leptospiros até o final da década de 1980 (Dikken et al., 1978) sendo que, atualmente, as amostras ainda são comumente referidas pelo sorovar. A classificação sorológica baseia-se em testes de aglutinação microscópica, definindo a nomenclatura de sorovar. São agrupados no mesmo sorovar os isolados que apresentam reatividade cruzada com soros de animais infectados com sorovares determinados. Atualmente, as leptospiros são classificadas em mais de 250 sorovares distribuídos em 24 sorogrupos diferentes (Bharti et al., 2003; Faine et al., 1999; Farr, 1995; Levett, 2001). A diversidade de sorovares reside na heterogeneidade de carboidratos que compõem a cadeia lateral dos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana bacteriana, que podem refletir um caráter adaptativo para a infecção de uma gama maior de novas espécies hospedeiras (Bharti et al., 2003; Faine et al., 1999; Farr, 1995).

Com o advento de técnicas moleculares, a classificação por sorovares começou a ser revisada. A classificação molecular do gênero *Leptospira* baseia-se no grau de hibridização por homologia de DNA (ácido desoxirribonucleico) (Brenner et al., 1999). Assim, o gênero divide-se em 17 espécies definidas, com pelo menos 70% de similaridade gênica, e com divergência de pelo menos 5% de bases não pareadas. Por esta classificação, os sorovares são encontrados em mais de uma espécie. Embora a reclassificação por genotipagem seja taxonomicamente mais confiável, ainda requer maior amplitude e refinamento, permanecendo motivo de controvérsia entre os microbiologistas por ser incompatível com o sistema sorológico adotado por clínicos e epidemiologistas (Bharti et al., 2003).

### **1.2.2 Aspectos biológicos e morfológicos das leptospiros**

As leptospiros são células longas, finas e helicoidais, exibindo espiras curtas e regulares para o lado direito (Faine et al., 1999). Suas extremidades são encurvadas em forma de ganchos típicos. Apresentam dois flagelos periplasmáticos axiais, ancorados cada um em uma das extremidades da célula, que se prolongam em direção ao centro celular, sem sobreposição (Charon e Goldstein, 2002; Goldstein et al., 1994). Sua mobilidade se dá por rotação, impulsionada pelos flagelos periplasmáticos. Em geral, têm tamanho de 0,1 a 0,15 µm de diâmetro por 6,0 a 12,0 µm de comprimento. Não é possível observá-las em microscópio óptico comum, mas podem ser visualizadas em microscópio de campo escuro ou

contraste de fase (Faine et al., 1999). A maioria não é corada pela técnica de Gram, mas podem ser visualizadas por impregnação por sais de prata.

Na membrana externa, os LPS constituem os principais antígenos de leptospiras. São estruturalmente semelhantes aos LPS de organismos gram-negativos típicos, contudo relativamente pouco tóxicos para células ou animais (Faine et al., 1999; Werts et al., 2001). Os LPS são comumente compostos por três segmentos ligados covalentemente: lipídeo A, *core*, e antígeno O. O lipídeo A é a porção lipídica, que ancora o LPS à membrana externa celular, e possui características únicas em *Leptospira*, incluindo uma unidade dissacarídica de glucosamina metilada e fosforilada (Que-Gewirth et al., 2004). O *core* é a porção polissacarídica que forma a região intermediária e, mais externamente, localiza-se o antígeno O, que consiste em grupos polissacarídicos altamente variáveis. O antígeno O é considerado o principal agente antigênico do LPS das bactérias gram-negativas (Faine et al., 1999). Curiosamente, o LPS de *Leptospira* induz resposta imune inata em humanos via receptor do tipo Toll 2 (TLR2, *Toll-like receptor 2*), ao invés de TLR4, o receptor clássico de LPS bacterianos (Nahori et al., 2005; Que-Gewirth et al., 2004).

Os demais constituintes da membrana externa são proteínas de membrana (OMPs, *outer membrane proteins*), sendo em sua maioria proteínas lipidadas, as lipoproteínas (Haake e Matsunaga, 2010; Malmstrom et al., 2009). Estima-se que as leptospiras apresentem mais de 300 OMPs, entre lipoproteínas e proteínas transmembrana, sendo que a maior parte delas não apresenta homólogos em outros organismos nem função definida. Devido à sua localização, acredita-se que as OMPs sejam importantes para a patogênese, mediando interações patógeno-hospedeiro.

### 1.2.3 Metabolismo e cultivo das leptospiras

As leptospiras são micro-organismos quimio-organotróficos aeróbicos, que utilizam oxigênio como aceptor final da cadeia de transporte de elétrons. Em condições de cultivo em laboratório, não utilizam açúcares ou aminoácidos como fonte energética, embora possuam os genes codificadores para todas as enzimas da via glicolítica (Nascimento et al., 2004b). A fonte de carbono e energia utilizada são ácidos graxos de cadeia longa, metabolizados por  $\beta$ -oxidação (Faine et al., 1999). Os carboidratos podem ser sintetizados pelo ciclo do ácido tricarbóxico, via das pentoses-fosfato não oxidativa, e vias do glioxalato ou fosfogluconato (Faine et al., 1999). São catalase e oxidase positivas, mas não possuem superóxido dismutase (Nascimento et al., 2004b).



As leptospirosas podem ser cultivadas *in vitro* em meios de cultura artificiais. O meio de cultura mais utilizado é o Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), que possui ácidos graxos complexados a sorbitol como fonte de carbono e albumina sérica bovina (BSA, *bovine serum albumin*) como agente detoxificante. Geralmente, suplementa-se o meio EMJH com 8-12% de soro de coelho levemente hemolisado como fonte de ferro, cianocobalamina, albumina, ácidos graxos, e outros nutrientes (Faine et al., 1999). Em substituição ao soro de coelho, há disponíveis suplementos comerciais sintéticos.

As culturas crescem em condições ótimas de potencial de hidrogênio (pH) e temperatura de 7,2 a 7,6 e entre 28 a 30 °C, respectivamente (Levett, 2001). As densidades das culturas não alcançam as obtidas com outras bactérias, mas atingem concentrações de  $10^7$  a  $10^8$  células/mL, com turbidez visível a partir do quarto ou quinto dia (Faine et al., 1999). Isolados clínicos de mamíferos são dificilmente cultiváveis, podendo permanecer em fase estacionária por dias ou semanas, não apresentando bom crescimento nem em temperatura fisiológica de 37 °C.

### 1.3 A LEPTOSPIROSE

#### 1.3.1 Distribuição e prevalência

A leptospirose é uma das zoonoses mais disseminadas mundialmente, causada por espécies patogênicas de *Leptospira* (Bharti et al., 2003; Faine et al., 1999; Vinetz, 2001). A leptospirose tem ampla distribuição geográfica, acometendo desde regiões tropicais e subtropicais, até zonas temperadas. É endêmica em diversos países, oferecendo potencial epidêmico. Epidemias podem estar associadas com mudanças de comportamentos humanos, contaminação da água, variações na densidade de animais carreadores ou a desastres naturais, como ciclones e enchentes (Organização Mundial de Saúde, *World Health Organization*, WHO) (WHO, 2003). A doença vem sendo considerada um importante problema de saúde pública devido à sua crescente incidência (Meites et al., 2004; WHO, 2003).

A incidência da leptospirose é baixa nos países desenvolvidos, estando principalmente associada às atividades recreativas envolvendo contato com água ou atividades ocupacionais consideradas de risco, como veterinários, fazendeiros, mineradores ou trabalhadores de abatedouros (Haake et al., 2002; Hartskeerl et al., 2011). Já nos países em desenvolvimento, a incidência parece ser crescente, sendo que nos últimos anos, várias epidemias vêm sendo relatadas (Hartskeerl et al., 2011), acometendo principalmente regiões metropolitanas

periféricas com precária rede sanitária. Essa prevalência está associada às condições climáticas (ambiente quente e úmido) que favorecem a sobrevivência das bactérias livres no ambiente durante seu ciclo de transmissão, e às deficitárias redes de saneamento básico, que propiciam a proliferação dos roedores, os principais vetores da doença. Assim, no contexto urbano, a leptospirose atinge principalmente pessoas de baixo nível socioeconômico, e o seu controle está diretamente relacionado a melhorias nas condições de saneamento básico (Reis et al., 2008).

Os índices da ocorrência anual de casos humanos da leptospirose não são precisamente conhecidos, já que esses dados são falhos ou ausentes em diversos países, especialmente na África. De acordo com as informações atualmente disponíveis, a incidência varia de aproximadamente 0,1 a 1/100.000 por ano em regiões temperadas, até 10 a 100/100.000 por ano em climas tropicais úmidos. Durante epidemias, a incidência pode chegar a 100/100.000 (WHO, 2003). Assim, estima-se que mais de 500.000 casos de leptospirose ocorram a cada ano no cenário mundial (WHO, 2003). Alguns estudos ainda mostram que a leptospirose pode representar 20 a 40% das doenças febris de origem desconhecida (Ko et al., 1999). Apesar de bastante significativos, acredita-se que esses números sejam subestimados devido à falha no diagnóstico ou falta de notificação dos órgãos competentes.

No Brasil, a leptospirose é uma doença de notificação compulsória desde o ano de 1985. Em todo o país, o número de casos confirmados no período de 1997 a 2010 foi de 47.782, com média anual de 3.413 casos. Desses pacientes, 5.054 foram a óbito (361 óbitos/ano) (Secretaria de Estado da Saúde/Secretaria de Vigilância de Saúde/Ministério da Saúde, SINAN/SVS/MS, 2012). No Estado de São Paulo, no ano de 2011, houve 5.713 casos notificados, sendo 958 casos confirmados laboratorialmente, atingindo a taxa de letalidade de 11,38%. No período de 1986 a 2011, o total de casos confirmados no Estado foi de 17.395, com 2.201 óbitos, consistindo em médias anuais de 669 casos/ano, 84 óbitos/ano, e taxa de letalidade média anual de 13% (SINAN – Divisão de Zoonoses/ Centro de Vigilância Epidemiológica/Coordenadoria de Controle de Doenças/Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, SINAN/CVE/CCD/SES-SP, 2012).

### **1.3.2 Impactos econômicos da leptospirose**

No Brasil, em outros países da América Latina e em países asiáticos como a Índia, por exemplo, a leptospirose é um grave problema de saúde pública (Bharadwaj et al., 2002; Ko et al., 1999; Lomar et al., 2000). Quando diagnosticada, o tratamento envolve uma combinação

de antibióticos e medidas de suporte. Nos casos mais graves, o tratamento requer hospitalização com necessidade de diálise renal, tratamento dos quadros hemorrágicos e acompanhamento intensivo. Assim, além de sua alta letalidade, a leptospirose representa um problema econômico para o sistema de saúde pública, uma vez que o tratamento é de alto custo hospitalar (Faine et al., 1999).

Além do elevado impacto econômico social, essa zoonose ainda acarreta grande impacto econômico na pecuária, pois, além de humanos e roedores, as leptospirosas infectam mamíferos de valor comercial agregado. Deste modo, é uma importante doença infecciosa relacionada a transtornos da reprodução, acometendo rebanhos de bovinos, suínos, equinos e outros. Nos bovinos, as leptospiroses causam consideráveis perdas econômicas em decorrência de repetições de cio, infertilidade, mastites, abortos, natimortalidade, bezerros prematuros, nascimento de bezerros fracos, mortes, e decréscimo na produção leiteira e de carne (Faine et al., 1999; Sheldon e Dobson, 2003).

### 1.3.3 Ciclo de transmissão

O ciclo de transmissão da leptospirose envolve o meio ambiente, hospedeiros de manutenção assintomáticos e hospedeiros susceptíveis à doença. A transmissão entre os hospedeiros pode ser direta ou indireta. A transmissão direta ocorre quando leptospirosas presentes em tecidos, fluidos corporais ou urina de animais com infecção aguda ou carreadores assintomáticos crônicos entram em contato com novos hospedeiros, iniciando a infecção. A transmissão direta é comum entre grupos ocupacionais que trabalham com animais ou seus tecidos. Entre humanos, a transmissão direta é extremamente rara, embora já reportada (Bolin e Koellner, 1988).

A transmissão indireta ocorre quando animais ou humanos entram em contato com leptospirosas presentes no meio ambiente, oriundas geralmente da urina de hospedeiros de manutenção (Faine et al., 1999). Embora sejam vulneráveis aos fatores ambientais, em especial ao ressecamento, as leptospirosas podem sobreviver por longos períodos na água e solo, podendo inclusive multiplicar-se em condições favoráveis (Baker e Baker, 1970). Quase toda espécie de roedores, marsupiais e de mamíferos pode ser carreadora e excretora de leptospirosas (Faine et al., 1999). Esses animais albergam as bactérias nos rins e as eliminam vivas no meio ambiente, re-infectando constantemente o solo, a água e outros animais. Os principais reservatórios urbanos são os roedores sinantrópicos, como *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato-preto) e *Mus musculus* (camundongo).

As principais vias de entrada das leptospiras nos hospedeiros são a pele e mucosas, por onde as bactérias parecem penetrar através de abrasões ou ativamente pelo tecido íntegro após exposição prolongada à água, por mecanismos ainda não compreendidos.

#### 1.3.4 Leptospirose humana

Os humanos são hospedeiros acidentais dentro da cadeia de transmissão de *Leptospira*, sendo a principal fonte para a sua infecção o contato com águas contaminadas (Faine et al., 1999; Plank e Dean, 2000). Geralmente, a leptospirose humana não é uma doença fatal. A doença ocorre pela penetração ativa dos microrganismos através das mucosas (ocular, digestiva, respiratória e genital), ou por meio da pele lesada ou mesmo íntegra (Bharti et al., 2003; Faine et al., 1999; Levett, 2001). Após a penetração, as leptospiras percorrem as vias linfáticas e sanguíneas, atingindo sítios imunologicamente privilegiados, como túbulos renais, fígado, cérebro e olhos, onde persistem e se multiplicam (Faine et al., 1999). O tempo de incubação da doença até o surgimento dos sintomas pode ser de algumas horas até 28 dias, sendo em média de 7 a 15 dias.

A apresentação clínica da leptospirose é bifásica, sendo que a fase aguda ou septicêmica (inicial) dura cerca de uma semana, seguido pela fase imune, caracterizada pela produção de anticorpos e excreção de leptospiras na urina, a leptospirúria (Levett, 2001). A fase inicial, denominada leptospiremia, manifesta-se com sintomatologia ampla e inespecífica, como febre, calafrios, cefaleia e mialgia, podendo ser confundida com outras doenças como gripe, dengue e outras doenças virais. O amplo espectro de sintomas clínicos é o principal motivo de a doença ser subdiagnosticada ou não reportada na maioria das vezes (Plank e Dean, 2000) gerando, assim, um baixo índice de casos notificados.

A leptospirose pode evoluir para uma condição mais severa, conhecida como síndrome de Weil (descrita por Weil em 1886), que corresponde a aproximadamente 5% a 15% dos casos. Esta manifestação clínica pode desenvolver-se para quadros caracterizados por hemorragias, icterícia, falência renal, meningite e hipotensão (Faine et al., 1999; Levett, 2001; Vinetz, 2001), atingindo letalidade de 15%, geralmente associada à falência múltipla de órgãos e hemorragia generalizada (Bharti et al., 2003). A severidade da doença parece depender do sorovar infectante, a carga de leptospiras, bem como a idade e condição imunológica do indivíduo infectado, porém ainda não foi totalmente compreendida. Observa-se que a síndrome de Weil normalmente está associada à infecção pelos sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni e Lai (Adler e de la Pena Moctezuma, 2010).

Além da síndrome de Weil, outra forma severa da leptospirose, denominada síndrome de hemorragia pulmonar associada à leptospirose (LPHS, *leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome*), vem sendo foco de atenção ultimamente. Esta síndrome, primeiramente identificada na Coreia do Norte e na China, vem sendo cada vez mais reportada mundialmente (Gouveia et al., 2008; McBride et al., 2005). Estima-se que os índices de mortalidade desta manifestação respiratória da doença possam chegar a 70% (Toyokawa et al., 2011). Os fatores responsáveis pela LPHS e a sua emergência não são conhecidos.

### 1.3.5 Diagnóstico da leptospirose

Como os sintomas da leptospirose são amplos e inespecíficos para a doença, a experiência clínica, a avaliação do ambiente epidemiológico e história clínica do paciente podem contribuir para o diagnóstico médico. Todavia, a confirmação da leptospirose só é possível através de diagnóstico laboratorial. Os métodos de diagnóstico de leptospirose disponíveis atualmente incluem microscopia, histopatologia, cultivo e sorologia – como teste de aglutinação microscópica (MAT), aglutinação macroscópica, hemaglutinação indireta, aglutinação micro capsular, ou ELISA (ensaio imunoenzimático, *enzyme-linked immunosorbent assay*) (Thongboonkerd, 2008).

Entre os métodos sorológicos, o mais utilizado é o MAT, sendo a técnica padrão-ouro recomendada pela OMS (WHO, 2003). No entanto, é um teste de difícil padronização, controle e interpretação, sendo realizado apenas em determinados laboratórios de referência. É um método relativamente pouco sensível e subjetivo. Além disso, um dos maiores problemas do seu emprego é a necessidade de manutenção de culturas de diferentes sorovares de leptospirosas vivas e virulentas para a reação com soro de pacientes. O MAT baseia-se na composição dos LPS de membrana, e na reatividade dos anticorpos dos soros dos pacientes com esses antígenos de superfície (Bharti et al., 2003). Na fase inicial da doença, o título de anticorpos séricos ainda é muito baixo (Faine et al., 1999) e a detecção de anticorpos na evolução da infecção humana é tardia, sendo as sorologias inteiramente confiáveis apenas a partir do quinto ao sétimo dias de doença (Levett, 2003), quando já podem haver muitos danos causados pelas bactérias instaladas no paciente (Bharti et al., 2003). Além do diagnóstico tardio, o MAT pode apresentar inespecificidades geradas por reações cruzadas entre os sorovares.

Como alternativa ao MAT, outros métodos têm sido empregados para o diagnóstico de leptospirose. Testes de ELISA têm se mostrado sensíveis e reprodutíveis, mas ainda não há um antígeno suficientemente precoce e específico para detectar a doença em sua fase inicial (Ahmad et al., 2005; Faine et al., 1999). Entre os métodos moleculares, técnicas de PCR (reação da polimerase em cadeia – *polymerase chain reaction*) vêm sendo desenvolvidas para a detecção de leptospiras nos tecidos e fluidos dos pacientes. Por PCR pode-se amplificar, seletivamente, sequências-alvo de DNA a partir de líquido e urina de indivíduos suspeitos de estarem infectados com leptospirose (Fonseca et al., 2006; Levett et al., 2005; Merien et al., 1992). Porém, o uso do método de PCR é limitado, demanda técnicas e reagentes moleculares específicos, sendo de difícil implantação principalmente em países pobres e regiões sem recursos ou estrutura adequados.

Recentemente, foi divulgado o desenvolvimento de um novo método diagnóstico baseado na proteína de membrana LigA de leptospiras. A proteína recombinante purificada LigA é imobilizada em um cartão, e o contato com uma gota do soro de paciente com suspeita de leptospirose permite a detecção da presença de anticorpos para esse antígeno (Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 2010).

### 1.3.6 Medidas profiláticas

Devido à multiplicidade de sorovares, fontes de infecção e transmissão, o controle da leptospirose é dificultado e dependente de condições locais específicas. Medidas preventivas devem considerar a identificação de grupos com risco particular de infecção e os fatores epidemiológicos locais, focando a fonte de infecção, a rota de transmissão ou a infecção ou doença. O risco de infecção pode ser minimizado evitando-se o contato com urina, animais ou ambientes infectados. A população deve ser conscientizada sobre a doença, e devem ser adotadas medidas de melhora na higiene, cuidados pessoais e saneamento.

Estão disponíveis atualmente no mercado vacinas para uso veterinário, obtidas a partir de preparação de leptospiras atenuadas ou inativadas. No entanto, a resposta imune desencadeada a partir dessas preparações é ativada principalmente pela porção polissacarídica dos LPS, estimulando uma resposta timo independente. Desta forma, não induzem memória imunológica e proteção em longo prazo contra a infecção. Além disso, são sorovar-específicas, ou seja, não promovem proteção cruzada contra sorovares diferentes dos inclusos na preparação vacinal (Faine et al., 1999; Levett, 2001).

Até o momento, somente Cuba e China possuem vacinas licenciadas para uso em humanos, compostas de bactérias inativadas (Martinez et al., 2004; Yan et al., 2003). Essas vacinas apresentam problemas semelhantes às de uso veterinário, sendo sorovar-específicas e requerendo administração periódica. Portanto, não existem vacinas eficientes para uso humano nem veterinário.

Dada a grande dificuldade de preparar uma vacina de LPS multivalente e eficiente, torna-se crítica a identificação de antígenos proteicos conservados para o desenvolvimento vacinal. Por isso, a busca de proteínas relacionadas à patogenicidade ou virulência, e que tenham um amplo espectro de conservação dentre os principais sorovares patogênicos ao homem vem sendo perseguida por vários grupos de pesquisa no mundo (Branger et al., 2005; Haake et al., 1999; Palaniappan et al., 2006; Yan et al., 2010).

## 1.4 PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE *LEPTOSPIRA* SPP

### 1.4.1 Mecanismos de patogenicidade

Apesar da sua importância na saúde pública e animal, até hoje pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares de patogenicidade e virulência das leptospiros. Contudo, é consenso que proteínas expostas na superfície, mantendo contato direto com o hospedeiro, são importantes durante o processo infeccioso. Nos últimos anos, os sequenciamentos genômicos de cinco cepas diferentes de *Leptospira* spp. revelaram um grande número de novas proteínas hipotéticas que podem estar envolvidas na patogenicidade (Bulach et al., 2006; Nascimento et al., 2004b; Picardeau et al., 2008; Ren et al., 2003). Ainda, mais recente, foram desenvolvidas técnicas de mutagênese direcionada e randômica por inserção de transposons, além da complementação genética de leptospiros transformadas com plasmídeos sintéticos, o que possibilitou o início da exploração do papel individual de genes e proteínas específicas na virulência (Bourhy et al., 2005; Croda et al., 2008; Murray et al., 2009a). No entanto, até o momento, foram identificadas poucas proteínas como fatores de virulência com contribuição para a patogênese da doença.

### 1.4.2 Adesão

Nos últimos anos, vem sendo bastante documentado que a interação de patógenos com proteínas de matriz extracelular (MEC) exerce um papel inicial importante na colonização do

hospedeiro. A aderência aos diferentes constituintes da MEC do hospedeiro é mediada por proteínas expostas na superfície dos micro-organismos (Boyle e Finlay, 2003). É bem estabelecido que a habilidade das bactérias espiroquetas de se aderirem às células eucarióticas e às proteínas de MEC seja crucial durante o início do processo de patogênese (Antonara et al., 2011; Bonazzi e Cossart, 2011), sendo que várias proteínas com características de adesinas já foram reportadas nos gêneros *Borrelia* e *Treponema* (Brown et al., 1999; Cameron, 2003; Cameron et al., 2004, 2005; Guo et al., 1998; Probert e Johnson, 1998; Probert et al., 2001).

Em leptospiros, o grupo de pesquisa no qual se realizou este trabalho caracterizou e descreveu diversas proteínas de membrana que têm função de adesão. Entre elas, Lsa24, a primeira proteína de leptospiros reportada que se liga à laminina (Barbosa et al., 2006), Lsa21, que interage com laminina, fibronectina plasmática e colágeno IV (Atzingen et al., 2008) Lsa27, ligante de laminina (Longhi et al., 2009) e Lsa63, que interage com laminina e colágeno IV (Vieira et al., 2010b), entre outras (Atzingen et al., 2010a). Outros grupos já demonstraram a capacidade de adesão a MEC das lipoproteínas LigA e LigB (proteína de leptospiros similar à imunoglobulina, *leptospiral immunoglobulin-like*) (Choy et al., 2007), das proteínas da família Len (proteína de leptospiros similar à endostatina, *leptospiral endostatin-like*) (Stevenson et al., 2007) e da lipoproteína majoritária de membrana de leptospiros, LipL32 (Hauk et al., 2008; Hoke et al., 2008). Em conjunto, esses dados indicam que as leptospiros apresentam múltiplas proteínas com função redundante de ligação aos componentes de MEC, sugerindo que o processo de adesão seja de fato importante para a virulência das leptospiros e início da infecção e colonização.

### 1.4.3 Evasão imune

Micro-organismos patogênicos desenvolveram inúmeras estratégias para camuflar sua presença e driblar o sistema imune dos hospedeiros. Aparentemente, utilizam múltiplas estratégias de escape combinadas para inibir o ataque pelas diversas etapas da resposta imune inata ou adaptativa. Assim, após sua entrada no hospedeiro, as leptospiros patogênicas devem ser capazes de contornar o sistema imune enquanto na circulação, para se propagarem aos órgãos e finalmente colonizar sítios imunologicamente privilegiados, como os túbulos renais proximais (Faine et al., 1999). Portanto, a eficiente colonização por leptospiros deve estar intimamente relacionada à sua destreza em modular o ataque pelo sistema imune, evadindo as



primeiras linhas de defesa do hospedeiro, consistindo na remoção por fagocitose ou destruição pelo sistema complemento (SC).

No que concerne a fagocitose, estudos demonstraram que as leptospiras são resistentes à fagocitose por neutrófilos (Cinco e Banfi, 1983; Wang et al., 1984), sendo fagocitadas apenas por macrófagos *in vitro* e *in vivo* (Cinco et al., 1981, 1982; Merien et al., 1997; Vinh et al., 1984). A interação de leptospiras com macrófagos parece ocorrer apenas na presença de anticorpos opsonizantes específicos (Banfi et al., 1982; Wang et al., 1984). No entanto, o destino dessas bactérias interior de macrófagos após a fagocitose ainda é controverso. Recentemente, foi demonstrado que, embora as leptospiras não sejam patógenos intracelulares clássicos, são capazes de invadir e induzir apoptose em macrófagos de algumas espécies hospedeiras e não de espécies carreadoras crônicas, o que parece estar ligado à susceptibilidade e severidade da doença (Li et al., 2010). Assim, sugere-se que as leptospiras utilizem a internalização em macrófagos como um mecanismo de escape do sistema imune, e que esta etapa seja essencial para o princípio da infecção (Li et al., 2010).

Além da resistência à fagocitose, a habilidade de invasão das leptospiras parece estar relacionada à aptidão de escape ao SC (Cinco, 2010). O SC é o principal componente da imunidade inata, e está envolvido na proteção contra micro-organismos invasores graças às suas habilidades opsonizantes, inflamatórias e líticas (Blom et al., 2009). Uma vez ativado, o SC destrói os micro-organismos eficientemente em minutos. No entanto, muitos patógenos desenvolveram a capacidade de evadir sua ação pela aquisição de proteínas reguladoras do sistema ou por expressão de proteínas inibitórias (Rautemaa e Meri, 1999). De fato, diversos patógenos expressam em sua superfície proteínas que podem sequestrar reguladores do SC do hospedeiro (FH, FHL-1 e C4BP; fator H, proteína similar ao fator H- 1 e proteína ligante de C4, respectivamente), suprimindo a cascata através das vias clássica ou alternativa (Blom et al., 2009; Lambris et al., 2008; Rooijackers e van Strijp, 2007; Zipfel et al., 2007).

Estudos pioneiros com o gênero *Leptospira* demonstraram que diversas cepas patogênicas permanecem viáveis após a exposição ao SC, enquanto que cepas não patogênicas são suscetíveis (Cinco e Banfi, 1983). A resistência foi correlacionada à interação com os reguladores FH e FHL-1, interferindo na ativação da via alternativa do SC ao impedir a ligação do fator B ao C3b, acelerar o decaimento de C3-convertase C3Bb e agindo como cofator para a clivagem de C3b pelo fator I (Meri et al., 2005). Foram identificadas algumas proteínas de membrana que atuam como receptores de FH e FHL-1, indicando redundância de função e, portanto, refletindo a importância do mecanismo para a evasão imune e

sobrevivência das leptospiros no hospedeiro (Castiblanco-Valencia et al., 2012; Verma et al., 2006).

Recentemente foi relatada a capacidade das leptospiros de interferirem com a via clássica do SC por ligação ao componente C4BP (Barbosa et al., 2009; Domingos et al., 2012). O C4BP é um regulador do SC que promove a clivagem de C4b mediada por fator I (Cinco, 2010). Isso ressalta que leptospiros virulentos possuem diversos mecanismos para aumentar a sua sobrevivência no hospedeiro.

#### 1.4.4 Lipoproteínas e proteínas de membrana

Nos sequenciamentos genômicos de *Leptospira*, foram identificadas inúmeras proteínas de membrana e lipoproteínas, sendo que a maioria foi classificada como hipotética, não apresentando homólogos em outros organismos (Nascimento et al., 2004a). Devido à sua localização, essas proteínas desempenham diversas funções relacionadas à adaptação e interação com o ambiente. Assim, permitindo contato direto com o hospedeiro, é consenso que as proteínas de membrana e lipoproteínas exerçam papel essencial na virulência e patogenicidade das leptospiros. No entanto, poucas já foram caracterizadas como fatores de virulência.

O primeiro fator de virulência geneticamente identificado em *Leptospira* foi a proteína de superfície Loa22 (Ristow et al., 2007). Mutantes construídos por inserção de *transposon* resultaram em atenuação da virulência em modelos de infecção aguda (hamsters e porquinhos da Índia). Entretanto, à parte sua essencialidade para a virulência, sua função permanece desconhecida. Vale ressaltar que *L. biflexa*, uma espécie saprofítica e não patogênica, apresenta o gene homólogo para Loa22 (Picardeau et al., 2008).

Muitos outros estudos realizados por técnicas de manipulação genética de leptospiros sugerem que uma característica única e intrigante dessas bactérias seja o alto nível de proximidade de função, o que torna difícil a identificação de fatores de virulência por inativação de genes únicos. Por exemplo, LipL32 é a proteína mais abundante da superfície de leptospiros (Malmstrom et al., 2009), sendo altamente conservada entre espécies patogênicas e ausente em espécie saprofíticas (Haake et al., 2000). É envolvida na interação com componentes de MEC (Hauk et al., 2008; Hoke et al., 2008) e expressa durante a infecção. No entanto, não está envolvida na colonização de carreadores assintomáticos nem na virulência durante a leptospirose aguda em hamsters (Murray et al., 2009c). Da mesma forma, as proteínas Lig são presentes apenas em espécies patogênicas, sua expressão é concomitante à

perda de virulência por atenuação (Matsunaga et al., 2003), LigA e LigB ligam-se à componentes de MEC (Choy et al., 2007) e sua expressão é aumentada em condições fisiológicas de osmolaridade (Matsunaga et al., 2005); contudo, a inativação de LigB não afeta a virulência (Croda et al., 2008).

#### **1.4.5 Outros mecanismos e fatores de virulência**

##### 1.4.5.1 LPS

Em leptospiros, o LPS é o principal antígeno gerador de resposta imune humoral durante a infecção. O *locus* gênico codificando para a biossíntese de LPS em leptospiros é extenso em comparação com o de outras bactérias gram-negativas, e acredita-se que tenha sido adquirido por transferência lateral, apresentando algumas características de ilha de patogenicidade (Barocchi et al., 2001; Bulach et al., 2000; de la Pena-Moctezuma et al., 1999). Estudos de mutagênese não direcionada em larga escala mostraram que esta região normalmente tem baixa inserção de transposons, sugerindo que os genes sejam essenciais para a viabilidade de *L. interrogans* (Murray et al., 2009a). Trabalhos posteriores descreveram dois mutantes com inserções no *locus* do LPS que não foram capazes de apresentar virulência em modelo de hamsters, sugerindo fortemente que o LPS seja essencial para a virulência das leptospiros (Murray et al., 2010).

##### 1.4.5.2 Motilidade e quimiotaxia

Para sobreviver no meio ambiente, as bactérias devem ser capazes de detectar e moverem-se em direção às condições favoráveis e contrárias às condições desfavoráveis. O sistema de quimiotaxia integra os sinais ambientais às respostas comportamentais mediadas por cadeias de transdução de sinal. Deste modo, quimiotaxia e motilidade são críticas para a virulência das leptospiros, permitindo a penetração através das barreiras teciduais dos hospedeiros e migração para os órgãos preferenciais de colonização (Charon e Goldstein, 2002). Análises genômicas e transcritômicas evidenciaram que leptospiros possuem múltiplas cópias de genes relacionados à quimiotaxia, que são regulados em resposta a diversos fatores relacionados à entrada no hospedeiro (Lo et al., 2006; Nascimento et al., 2004a; Qin et al., 2006; Ren et al., 2003). Da mesma forma, possuem cerca de 50 genes envolvidos com a

motilidade, indicando que possuem um complexo sistema flagelar e de movimentação (Charon e Goldstein, 2002).

Suportando a ideia de que a motilidade seja importante para a virulência de leptospiras, estudos recentes demonstraram que mutantes da proteína FlaA, constituinte do endoflagelo, apresentam capacidade infectante reduzida em hamsters, sendo incapazes de disseminar-se para os órgãos do hospedeiros e iniciar a colonização (Lambert et al., 2012).

#### 1.4.5.3 Captura de ferro no hospedeiro

Grupos heme constituintes da hemoglobina são a forma mais abundante de disponibilidade de ferro a patógenos durante a infecção (Andrews, 2000). Análises genômicas de *L. interrogans* revelaram que essas bactérias apresentam genes de aquisição de heme, consistente com relatos prévios de que leptospiras utilizam esses grupos como a principal fonte de ferro durante a infecção. Por técnicas de mutagênese por transposons, foi identificado e descrito um mutante para o gene hemeoxigenase, hemO, de *L. interrogans*, que revelou-se inviável em meios de cultura onde a única fonte de ferro era a hemoglobina. Por estudos em modelo animal, este gene foi classificado como fator importante para a virulência em animais, porém não essencial (Murray et al., 2009b).

#### 1.4.5.4 Proteínas Mce

As proteínas de entrada em células de mamíferos (Mce, *mammalian cell entry*) parecem contribuir para a invasão de células, incluindo macrófagos, por bactérias e vírus (Arruda et al., 1993; Senaratne et al., 2008). Essas proteínas possuem motivos RGD (arginina-glicina-aspartato), que medeiam a interação com integrinas nas superfícies celulares, possibilitando a adesão e desencadeando a invasão (Ruoslahti, 1996; Sato et al., 2009).

Como já revisado anteriormente, muitas evidências sugerem que a invasão de macrófagos seja uma etapa importante durante o estabelecimento da leptospirose (Li et al., 2007; Liu et al., 2007; Merien et al., 1997). Fundamentado nessas evidências, foi recentemente demonstrado que a proteína Mce de *Leptospira* é necessária durante as primeiras fases da infecção (Zhang et al., 2012). A expressão do gene aumenta quando em contato com macrófagos, e a proteína Mce é responsável pela aderência e invasão de macrófagos pelas leptospiras virulentas, sendo que sua deleção atenuou significativamente a

virulência dessas bactérias em modelo de hamsters. Propõe-se que a proteína Mce seja um novo fator de virulência de leptospiros (Zhang et al., 2012).

#### 1.4.5.5 Transcritômica: identificação de fatores de virulência em potencial

Ao longo do seu ciclo de transmissão, que compreende desde órgãos de animais selvagens ou humanos, até vida livre no solo ou na água, as leptospiros são sujeitas a condições ambientais amplamente distintas e variáveis (Haake et al., 2002). Para se adaptarem a condições nutricionais, sinalizadoras, quimiotáticas e de virulência tão divergentes, as leptospiros necessitam de uma regulação do conjunto de genes expressos em cada uma dessas condições. Embora se saiba que as leptospiros adaptam-se e sobrevivem em muitos ambientes diferentes, pouco é sabido a respeito da natureza molecular dessas adaptações.

Anterior à disponibilidade de dados gerados por experimentos de micro arranjos, era sabido que estímulos mimetizando condições *in vivo* durante a infecção afetam a expressão proteica em *Leptospira*, como as proteínas Qlp42 e LipL53, reguladas por temperatura (Nally et al., 2001; Oliveira et al., 2010), e LigA e LigB, reguladas por osmolaridade (Matsunaga et al., 2005). Para identificar outros genes diferencialmente expressos durante a infecção e apontar possíveis fatores de virulência, diversos estudos de micro arranjos foram realizados utilizando leptospiros crescidas sob diferentes condições de temperatura, osmolaridade e disponibilidade de soro ou ferro (Lo et al., 2006, 2010; Matsunaga et al., 2007; Patarakul et al., 2010; Qin et al., 2006). Essas análises geraram um número considerável de genes diferencialmente expressos que podem desempenhar papéis importantes na patogenicidade e virulência das leptospiros, e constituem avanços para o direcionamento de estudos mais minuciosos de novos mutantes ou proteínas envolvidas na infecção.

## 1.5 SISTEMAS PROTEOLÍTICOS

### 1.5.1 Sistema fibrinolítico

O sistema fibrinolítico ou sistema plasminogênio/plasmina (PLG/PLA) é uma cascata enzimática composta por diversas proteases séricas e inibidores, envolvidas na geração de PLA e regulação de sua atividade. A PLA exerce o papel central na fibrinólise, tendo por função primordial a degradação de fibrina, mas atuando também em outros processos proteolíticos uma vez que é capaz de degradar diversos constituintes da MEC.

O PLG é uma glicoproteína de cadeia única de 791 resíduos de aminoácidos produzida no fígado e presente em altas concentrações no plasma (~2  $\mu\text{M}$ ) (Lijnen, 2001) e na maioria dos fluidos extra vasculares. É um precursor (zimógeno) inativo que, após clivagem da ligação peptídica Arg<sup>561</sup>-Val<sup>562</sup> por ativadores proteolíticos, é convertido à sua forma ativa, a PLA. A PLA é composta por duas cadeias ligadas por ponte dissulfeto, contendo 561 e 230 resíduos de aminoácidos, respectivamente. A cadeia leve origina-se da porção amino-terminal (N-terminal) do PLG e abriga o sítio ativo homólogo ao de proteases do tipo serina, como tripsina e elastase. A cadeia pesada contém cinco domínios estruturais em forma de triplo-loop, denominados *kringle* (Lahteenmaki et al., 2001; Lijnen, 2001). Os domínios *kringle* possuem sítios de ligação aos resíduos de lisina, e medeiam as interações do PLG e da PLA com os substratos, reguladores e inibidores.

Fisiologicamente, existem dois tipos conhecidos de ativadores de PLG: tipo uroquinase e tipo tecidual (uPA e tPA, *urokinase-type* e *tissue-type plasminogen activators*). O tPA é produzido sobretudo por células endoteliais e constitui o principal ativador da fibrinólise no sangue, estando presente no plasma em concentração de 5 a 10 ng/mL. Já uPA é produzido por diversos tipos celulares e é o principal ativador associado à membrana celular, sendo importante na degradação mediada por células, como remodelamento tecidual, metástase tumoral e cicatrização (Lahteenmaki et al., 2001).

As atividades de uPA e tPA são inibidas principalmente por interação com inibidores da família das serpinas, com os quais formam complexos covalentes estáveis. O inibidor PAI-1 (inibidor de ativador de PLG tipo 1, *plasminogen activator inhibitor type 1*) é produzido por células endoteliais ou outros tipos celulares e é encontrado no plasma na concentração de 10 a 30 ng/mL. PAI-1 inibe tanto uPA quanto tPA, enquanto que o inibidor do tipo 2, PAI-2, produzido apenas por monócitos e macrófagos e detectado no plasma somente durante a gravidez, é capaz de inibir apenas uPA (Lahteenmaki et al., 2001).

A PLA, uma vez ativada, tem como principal inibidor fisiológico a serpina  $\alpha_2$ -antiplasmina, que forma um complexo reversível com a PLA ligando-se aos domínios *kringle* de afinidade à lisina. Segue-se uma reação irreversível na qual uma ligação covalente é formada entre o resíduo de serina presente no sítio ativo da PLA e o sítio ativo da  $\alpha_2$ -antiplasmina. Entretanto, uma vez que o PLG ou a PLA ligam-se aos receptores através dos mesmos domínios *kringle* que interagem com a  $\alpha_2$ -antiplasmina, estes ficam protegidos da sua ação inibitória (Collen e Lijnen, 2005). Outro regulador de atividade da PLA é o inibidor irrestrito de serino-proteases  $\alpha_2$ -macroglobulina, presente abundantemente no plasma humano.

No entanto, sua atividade apenas se dá quando a concentração sistêmica ou local de  $\alpha_2$ -antiplasmina é significativamente diminuída (Travis e Salvesen, 1983).

Enquanto ativadores e inibidores regulam a formação de PLA, a atividade da PLA é ainda controlada pelo direcionamento para regiões onde a atividade proteolítica é necessária via receptores de PLG. Uma série de células apresentam receptores de PLG em sua superfície, sendo os mais caracterizados a  $\alpha$ -enolase, anexina II e anfoterina (Lahteenmaki et al., 2001). Os sítios de ligação à lisina presentes nos domínios *kringle* do PLG reconhecem e ligam-se aos resíduos de lisina dos receptores.

### 1.5.2 Sistema de metaloproteases de matriz

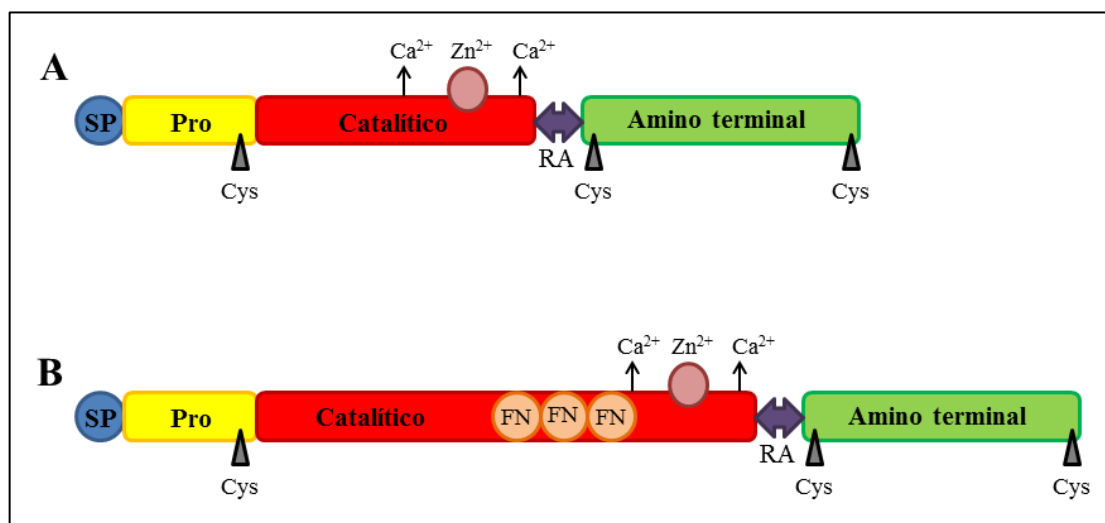
As metaloproteases de matriz (MMPs, *matrix metalloproteases*) constituem uma família de endopeptidases cálcio-dependentes, estrutural e funcionalmente relacionadas. São secretadas pelas células na forma inativa (latente), chamadas de pró-MMPs ou zimógenos, requerendo uma etapa de ativação para aquisição de atividade proteolítica de degradação de componentes de MEC. A família de MMPs humanas consiste em 23 enzimas separadas em seis grupos, com base nas características estruturais e a especificidade a diferentes substratos (colagenases, gelatinases, tipo de membrana, estromelinas, matrilisinas, e um grupo não nomeado) (Sbardella et al., 2012).

A estrutura básica de MMPs contém um peptídeo sinal N-terminal de exportação seguido de um domínio pró-peptídeo, um domínio catalítico que contém três histidinas conservadas na sequência His-Glu-X-X-His-X-X-Gly-X-X-His de ligação de  $Zn^{2+}$  e uma região rica em prolinas (região articular) que define a transição ao domínio N-terminal, responsável pela especificidade de substrato (Figura 1A). Todas as MMPs apresentam uma região conservada rica em glutamina e aspartato entre o sítio de ligação de  $Zn^{2+}$  e a região articular, que constitui o sítio de ligação de íons  $Ca^{2+}$  (Brinckerhoff e Matrisian, 2002).

As MMPs estão envolvidas em uma série de eventos fisiológicos relacionados ao remodelamento tecidual, como desenvolvimento embrionário, migração celular e cicatrização. Assim, devido à sua importância e potencial destrutivo de proteólise generalizada, as MMPs são finamente reguladas em diversos níveis, sendo que um pequeno desbalanço pode causar inúmeros eventos patológicos, como invasão microbiana, inflamação e danos teciduais (Sbardella et al., 2012). A regulação da atividade dessas proteases pode se dar em quatro níveis principais:

- a) expressão gênica;
- b) acúmulo e compartimentalização;
- c) ativação da pró-enzima;
- d) interação com inibidores (Chakraborti et al., 2003).

**Figura 1** – Estrutura esquemática dos domínios de MMPs



(A) Estrutura básica de uma MMP hipotética; (B) estrutura básica dos domínios das gelatinases MMP-2 e MMP-9. SP: peptídeo sinal de exportação para membrana ou secreção, Pro: domínio pró-peptídeo, Catalítico: domínio contendo sítio de ligação de  $Zn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , FN: inserto de domínios de fibronectina tipo II, RA: região articular; Cys: resíduos de cisteína.

FONTE: Vieira (2012).

Na maior parte, a produção de MMPs é regulada ao nível transcricional por sinais específicos que são temporalmente limitados e espacialmente confinados, como citocinas e fatores de crescimento. Pós-transcricionalmente, as MMPs são reguladas pela latência conferida pelo pró-peptídeo. A latência de pró-MMPs é mantida por interações entre o grupo tiol de uma cisteína conservada presente no pró-domínio e o zinco ligado ao sítio catalítico (Ra e Parks, 2007). Neste estado, o pró-domínio encobre o domínio catalítico, impedindo a interação com o substrato. A ativação pode se dar por clivagem proteolítica do pró-domínio pelas enzimas PLA, furina ou outras MMPs, ou de forma independente de proteases por mudanças conformacionais, seguido de autólise do pró-peptídeo (Ra e Parks, 2007).

Uma vez ativadas, as MMPs podem ser reguladas por inibição da atividade. Os principais inibidores de MMPs são a  $\alpha_2$ -macroglobulina, um inibidor não específico de proteases, e os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs, *tissue inhibitors of MMPs*). Os TIMPs formam complexos com as MMPs, retardando a ativação de pró-MMPs e inibindo a atividade



de MMPs ativas. Esses inibidores estão distribuídos em todos os tecidos e fluidos, sendo que sua concentração geralmente encontra-se em excesso em relação à disponibilidade de MMPs (Murphy, 2011; Ra e Parks, 2007).

#### 1.5.2.1 Gelatinases

As gelatinases são as MMPs definidas de acordo com sua afinidade por colágeno desnaturado (gelatina). Essa classe inclui dois membros, nomeadamente gelatinase A e gelatinase B, ou MMP-2 e MMP-9, respectivamente. A estrutura das gelatinases difere das demais MMPs por apresentar a inserção de um domínio de afinidade ao colágeno no domínio catalítico, constituído por domínios repetidos de fibronectina (Sbardella et al., 2012) (Figura 1B). As gelatinases estão intimamente relacionadas aos processos inflamatórios e progressão tumoral, estando envolvidas na origem de diversas patologias (Hua et al., 2011; Sbardella et al., 2012). Diversas evidências indicam que MMP-2 possua efeito pró-homeostático, enquanto MMP-9, atividade pró-inflamatória (Ram et al., 2006; Van den Steen et al., 2002).

A MMP-2 é constitutivamente expressa por virtualmente quase todas as células, principalmente por fibroblastos, células endoteliais e epiteliais. É detectada em concentrações significantes no plasma em condições fisiológicas devido à sua função homeostática (Van den Steen et al., 2002), e degrada principalmente citocinas e fatores de crescimento. A MMP-2 é fracamente induzível por estímulos, e sua atividade é fortemente regulada por TIMPs, particularmente do tipo 2, 3 e 4.

MMP-9 apresenta atividade proteolítica sobre os mesmos substratos que MMP-2, porém com diferentes afinidades, sendo que os principais alvos são componentes de MEC e membrana basal (MB). Diferentemente de MMP-2, essa protease é altamente induzível, e sua expressão fisiológica é limitada a um grupo restrito de tipos celulares, principalmente do sistema imunológico (Van den Steen et al., 2002). Portanto, sua distribuição é bem definida e geralmente ocorre associada a diversas condições anti-homeostáticas.

#### **1.5.3 Interação sistema fibrinolítico e MMPs**

Diversas interações moleculares entre o sistema PLG/PLA e o sistema de MMPs indicam que estes atuam em conjunto na degradação de MEC, requisito primordial para a migração celular e remodelamento tecidual. Embora a PLA tenha como principal alvo a degradação de fibrina, também participa do processo de degradação e remodelamento de

MEC por ser capaz de clivar diretamente alguns componentes de MEC como fibronectina, laminina e proteoglicanas, e também indiretamente, estes e outros componentes, por ativação proteolítica de pró-MMPs latentes e heparanases. A PLA pode ativar diretamente pró-MMP-1, pró-MMP-3, pró-MMP-9, pró-MMP-10 e pró-MMP-13. Pró-MMP-2 também pode ser ativada diretamente pelo ativador de PLG uPA.

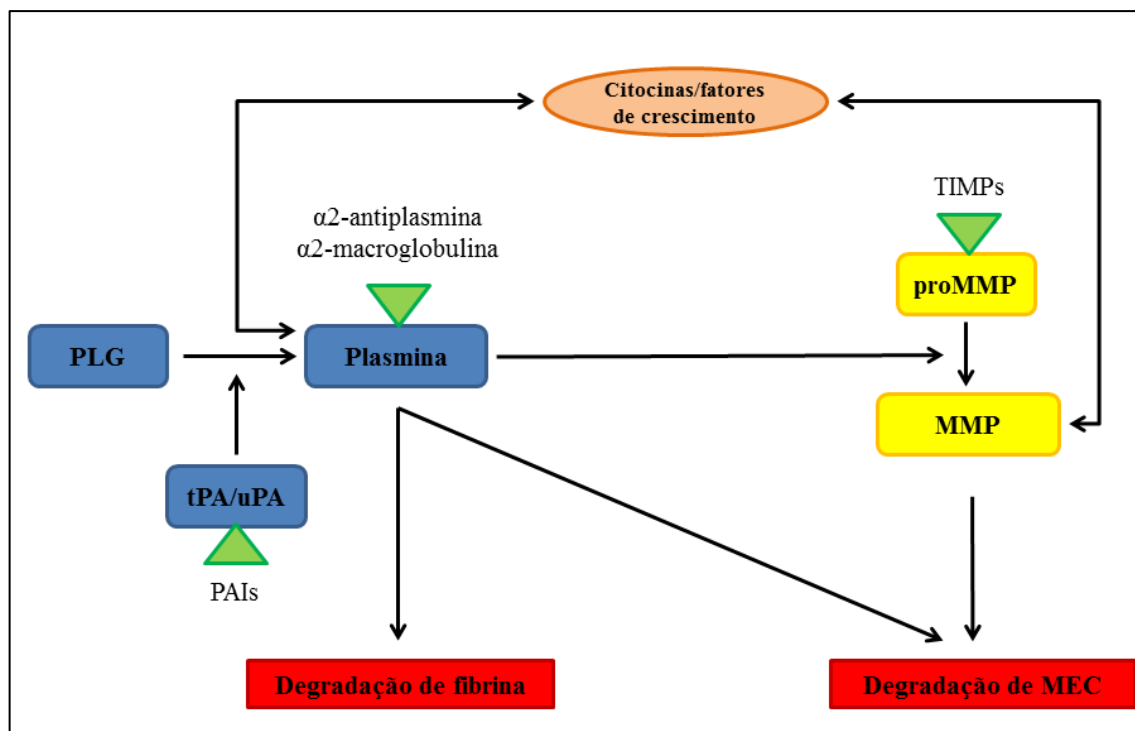
Por outro lado, MMPs ativas também interagem com componentes do sistema fibrinolítico, afetando a fibrinólise e atividade da PLA (Lijnen, 2002). Já foi demonstrado que diversas MMPs são capazes de clivar PLG tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Brauer et al., 2011; Lijnen et al., 1998; O'Reilly et al., 1994; Patterson e Sang, 1997; Pozzi et al., 2000; Sang, 1998), gerando angiostatina, que compreende os quatro primeiros domínios *kringle* do PLG e é um inibidor da angiogênese e da resposta imune. MMP-3 pode clivar uPA, separando o domínio catalítico do domínio de ligação ao receptor, porém sem afetar a atividade catalítica, provavelmente resultando em menor acúmulo de uPA na superfície celular, consequentemente gerando menor conversão de PLG à PLA (Orgel et al., 1998; Ugwu et al., 1998). MMP-3 hidrolisa ainda  $\alpha_2$ -antiplasmina, impedindo que se forme o complexo estável inibidor-PLA, o que pode constituir um mecanismo de favorecimento de proteólise mediada por PLA localizada. MMP-3 também hidrolisa e inativa PAI-1, beneficiando a fibrinólise.

Adicionalmente, MMPs degradam citocinas e fatores de crescimento que afetam a geração de PLA, enquanto que a PLA favorece a liberação de fatores de crescimento latentes que por sua vez podem interferir na regulação de MMPs. Algumas das interações mencionadas entre os sistemas proteolíticos PLG/PLA e MMPs estão simplificada e esquematizadas na Figura 2.

#### **1.5.4 Interação de patógenos com o sistema proteolítico PLG/PLA**

Durante o processo infeccioso de diversos micro-organismos, a penetração pelos tecidos do hospedeiro para alcançar a circulação e sítios secundários de infecção é uma etapa crucial. Para isso, a atividade proteolítica tem se mostrado essencial na patogênese bacteriana ao que permite a transposição de barreiras mecânicas impostas pela MEC, MB, tecidos epiteliais e endoteliais (Lahteenmaki et al., 2001). A proteólise associada às infecções pode ter várias funções: aumento da permeabilidade vascular, invasão da corrente sanguínea ou de locais secundários de infecção, liberação de nutrientes e danos teciduais. Em resumo, a degradação de estruturas teciduais por proteases potencializa a disseminação através do hospedeiro seja por ultrapassar as barreiras físicas, seja por propiciar condições nutricionais.

**Figura 2** – Representação esquemática da ativação de PLA e MMPs e as possíveis interações entre os dois sistemas proteolíticos



Os triângulos verdes indicam os inibidores de enzimas e pró-enzimas:  $\alpha 2$ -antiplasmina e  $\alpha 2$ -macroglobulina atuando sobre a plasmina, TIMPs ligando-se às pró-MMPs e PAIs inibindo a ação de uPA e tPA. Os retângulos vermelhos representam os substratos para as enzimas plasmina e MMPs. Fatores de crescimento e citocinas são regulados por MMPs e plasmina, ao mesmo tempo que influenciam na disponibilidade de atividade das mesmas.

FONTE: Vieira (2012).

As barreiras teciduais de mamíferos são principalmente formadas por MECs e MBs, as quais as bactérias devem penetrar para atingir a circulação sanguínea. As MECs e MBs contêm colágenos, laminina, fibronectina, proteoglicanos e elastina como principais componentes. No entanto, a produção de enzimas proteolíticas capazes de degradar componentes de MEC (principalmente colagenases) é limitada a um número restrito de patógenos bacterianos durante a infecção (Lahteenmaki et al., 2001).

Muitas bactérias invasoras são extracelulares e necessitam de mecanismos ativos de penetração nos tecidos. Esses mecanismos consistem muitas vezes na utilização, em seu favor, de cascatas de sistemas dependentes de proteases dos hospedeiros como coagulação, fibrinólise, ativação do SC e fagocitose (Bergmann e Hammerschmidt, 2007; Colman et al., 1998; Herwald et al., 1998; Pizarro-Cerda e Cossart, 2006; Rossmann et al., 2007; Severi et al., 2007; Travis et al., 1995). As bactérias podem regular estas cascatas diretamente através

de suas proteases ou componentes expostos na membrana, ou indiretamente, estimulando a liberação de moléculas efetoras pelo hospedeiro.

Pelo grande espectro de atividade da PLA e a alta concentração no plasma do seu precursor, o PLG, o sistema fibrinolítico de mamíferos oferece condições que possibilitam o seu uso por bactérias patogênicas. A PLA degrada diretamente diversos componentes de MEC e causa danos indiretos à MB e MEC ao ativar MMPs, resultando assim em potencial destrutivo de desestruturação de MEC e tecidos endoteliais (Gebbia et al., 2001; Lahteenmaki et al., 2005; Liotta et al., 1981a,b).

De fato, nos últimos anos, muitos estudos têm demonstrado esse mecanismo bacteriano ao fornecer entendimento acerca da função do sistema do PLG/PLA durante a infecção (Bergmann e Hammerschmidt, 2007; Degen et al., 2007; Lahteenmaki et al., 2005; Sun, 2006). A maioria das evidências *in vivo* demonstrando a importância do sistema do PLG/PLA na patogenicidade bacteriana vem de estudos em doenças que se iniciam subcutaneamente. Uma das visões emergentes é que as bactérias invasoras responsáveis por essas infecções compartilhem duas propriedades: expressão de receptores e/ou ativadores de PLG, bem como capacidade de adesão a componentes de MEC e MB.

Pela forma de interação com o sistema PLG/PLA por expressão de receptores de PLG, as bactérias conseguem imobilizá-lo em sua superfície e, após a ativação por conversão à PLA (seja por ativadores endógenos ou ativadores do próprio hospedeiro), passam a funcionar como organismos proteolíticos. A capacidade proteolítica dos micro-organismos ligados à PLA aumenta a sua virulência ao permitir a degradação de MEC e MB, incrementando a capacidade de invasão e colonização. A expressão de receptores de PLG já foi reportada em várias espécies de bactérias patogênicas gram-positivas e gram-negativas (Lahteenmaki et al., 2001). Entre as espiroquetas, grupo ao qual pertencem as leptospiras, essa habilidade foi demonstrada em *T. denticola* (Fenno et al., 2000) e diversas espécies do gênero *Borrelia* (Lagal et al., 2006). Os receptores caracterizados são, em sua maioria, proteínas expostas na superfície bacteriana, principalmente lipoproteínas, que, geralmente, têm outras funções como adesão, transporte, metabolismo e interação com o sistema imune (Lahteenmaki et al., 2001).

Considerando-se a espiroqueta *Borrelia*, estudos mostraram que o PLG liga-se a múltiplas proteínas nas diversas cepas analisadas, e que a captação de PLA na superfície dessas bactérias promove a degradação de componentes de MEC e a migração através de monocamadas endoteliais e MEC artificial *in vitro* (Coleman e Benach, 2000; Coleman et al., 1995, 1999). Ainda, foi demonstrado que bactérias virulentas ligam-se mais eficientemente à PLA do que bactérias atenuadas, possivelmente por expressarem maior número de receptores

ou receptores alternativos, reforçando a importância desse sistema para a patogênese e virulência (Coleman e Benach, 2000). Além de possuir receptores de PLG, *Borrelia* tem mecanismos de indução da sua ativação para a forma enzimaticamente ativa, a PLA. Dados indicam que não só bactérias viáveis, mas também lipoproteínas purificadas são capazes de induzir níveis elevados de ativadores de PLG em monócitos, que se acumulam em infiltrados inflamatórios na infecção (Coleman et al., 2001; Haile et al., 2006). Um fato ressaltado nos trabalhos é a capacidade de adesão de *Borrelia* a MEC, o que pode ser importante no direcionamento dessas bactérias para esses sítios.

Ainda, dois estudos independentes com *Borrelia* mostraram que a imobilização de PLA na superfície promove invasão tecidual e disseminação nos tecidos, levando à espiroquetemia. A capacidade proteolítica eleva a passagem através da barreira hematoencefálica e aumenta a invasão de rins, cérebro e coração. Experimentos de infecção em camundongos deficientes em PLG indicam que o PLG é essencial para a migração das espiroquetas através de vasos sanguíneos e para a eficiente disseminação para outros órgãos (Coleman et al., 1997; Haile et al., 2006).

### **1.5.5 Micro-organismos e o sistema proteolítico de MMPs**

No evento de uma invasão microbiana, o sistema imunológico é desafiado e deve primeiramente recrutar leucócitos para o sítio da infecção, erradicar o patógeno e, finalmente, suprimir a resposta para que se cesse a inflamação sistêmica ou local. As MMPs exercem papel primordial neste processo tanto por permitir a degradação de MEC, quanto pela modulação de citocinas e atividade quimiotática, culminando na atração e migração de células efetoras ao sítio de infecção. Portanto, a migração de células inflamatórias é dependente da atividade de MMPs (Elkington et al., 2005).

Embora sejam necessárias para a resposta imune, paradoxalmente, as MMPs podem causar imunopatologias relacionadas à infecção. Danos teciduais podem ser causados pelo excesso de atividade dessas proteases, resultando de secreção aumentada de MMPs ou diminuída de TIMPs. O número de infecções durante as quais a atividade de MMPs afeta negativamente o hospedeiro é vasto, compreendendo agentes virais, bacterianos, protozoários, fúngicos e parasitas (Elkington et al., 2005; Sbardella et al., 2012). Dentre as bactérias espiroquetas, é relatada a influência da atividade exacerbada de MMPs nas patologias da doença de Lyme (Behera et al., 2005; Heilpern et al., 2009; Hu et al., 2001) e periodontite

(Gaibani et al., 2010; Miao et al., 2011), causadas por espécies de *Borrelia* e *Treponema*, respectivamente.

Como revisado por Amalinei et al. (2010), o papel de MMPs em patologias pode ser agrupado em três grupos:

- a) destruição tecidual, como no câncer e metástase, artrite reumatóide, osteoartrite, doenças neuroinflamatórias e úlcera gástrica;
- b) fibrose, como na cirrose, arterosclerose e esclerose múltipla;
- c) enfraquecimento da matriz, como em aneurismas da aorta e cardiomiopatias de dilatação.

## 1.6 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PESQUISA

Apesar da sua importância, os mecanismos moleculares da patogênese, virulência e processo infeccioso das leptospiros permanecem não compreendidos. Mesmo após os sequenciamentos genômicos, poucas proteínas foram caracterizadas como tendo papel direto na patogênese. Tendo em vista a breve literatura citada, relatando a capacidade de adesão de proteínas de leptospiros aos componentes de MEC, adicionado ao fato de a leptospirose iniciar-se na pele com posterior disseminação para sítios secundários de infecção, e a capacidade de outras espiroquetas e patógenos de fazerem uso do sistema do PLG/PLA, levou à proposição da investigação da participação desse mecanismo na patogenicidade das leptospiros. Como em outras bactérias patogênicas e, especialmente, nas espiroquetas *Borrelia* spp. e *T. pallidum*, esse sistema pode ser importante para a disseminação das leptospiros no hospedeiro ao degradar componentes de MEC e tecidos e promover a penetração para órgãos preferenciais de infecção como rins e fígado a despeito da ausência de proteases secretadas com capacidade proteolítica.

## 5 CONCLUSÕES

Ao longo deste trabalho de doutorado, foi reportada pela primeira vez a interação de leptospiros com o sistema fibrinolítico do hospedeiro, através da captura de PLG na superfície. Os dados sugerem que este mecanismo seja de grande importância para a virulência dessas bactérias, já que diferenças foram encontradas entre leptospiros virulentos e atenuados em cultura, indicando expressão diferencial. A presença de inúmeros receptores de PLG na superfície desses micro-organismos reforça a importância desta atividade para a virulência. Foram identificadas diversas proteínas de leptospiros que podem atuar como receptores de PLG durante a infecção, sendo possíveis fatores de virulência que merecem ser mais bem estudados.

Foi demonstrada por outros grupos a interação de leptospiros com reguladores do SC, resultando em proteção por conferir capacidade de escape ao sistema imune inato. Os resultados aqui discutidos adicionam a participação da PLA capturada pelas leptospiros na evasão imune dessas bactérias no hospedeiro. A PLA foi capaz de diminuir a deposição de IgG e C3b na superfície de *Leptospira*, o que pode ter implicações na diminuição da fagocitose por macrófagos mediada por anticorpos e na supressão da cascata de ativação do SC, e aumentou a resistência ao ataque pelo complemento. Estes dados reforçam a ideia da importância da atividade de escape ao sistema imune para o estabelecimento da leptospirose, ao que parece que as leptospiros apresentam diversas estratégias de inibição de mecanismos de defesa dos hospedeiros atuando em conjunto.

Até o momento, não foram identificadas proteínas de leptospiros capazes de degradarem componentes de MEC, o que pode ser contornado pela propriedade de degradação conferida pela PLA capturada na superfície das leptospiros. Por técnicas de cultura celular, foi demonstrado o efeito direto desta atividade proteolítica, de modo que houve a facilitação da penetração por monocamadas de células endoteliais. Este constitui o primeiro mecanismo descrito para a atividade de penetração ativa das leptospiros.

Além da capacidade de ligação ao PLG, foi apresentada outra forma de interação das leptospiros com o sistema fibrinolítico. As leptospiros mostraram-se capazes de induzir a produção de ativadores de PLG, demonstrado tanto pelo contato com células endoteliais *in vitro*, quanto durante a infecção natural, pela análise de soro de pacientes diagnosticados com leptospirose. Esse resultado implica no desbalanço da regulação do sistema fibrinolítico, culminando na formação de PLA. Esta atividade aumenta a disponibilidade de ativadores no hospedeiro, suprimindo a falta de mecanismos endógenos de conversão à PLA pelas leptospiros.

Adicionalmente, os maiores níveis de ativadores de PLG foram observados no início da infecção, reforçando a importância desse mecanismo para a penetração ativa das leptospiros nos primeiros estágios da leptospirose.

Com base nos dados obtidos e as interações diretas entre os sistemas PLG/PLA e de MMPs, hipóteses de que as leptospiros pudessem alterar a expressão e atividades de MMPs nos hospedeiros foram levantadas. Os resultados obtidos a partir de culturas de células humanas e soros de indivíduos infectados apontam para um fenômeno nunca antes descrito para a leptospirose: aumento da expressão de MMPs, mais precisamente, a MMP-9. A MMP-9 está envolvida em uma série de infecções e eventos patológicos. Sua maior expressão e atividade durante a leptospirose pode ter diversas implicações no estabelecimento e patologia da doença, e merece mais estudos para melhor caracterização e compreensão do processo.

Em conjunto, os resultados indicam a importância da aquisição de PLG e ativação da PLA durante a leptospirose. Além de capturar PLG, as leptospiros são capazes de estimular a ativação do sistema fibrinolítico, configurando um desbalanço na regulação desse sistema, de modo a favorecer a formação de PLA na superfície dessas bactérias. Adicionalmente, a presença de leptospiros e maior geração de PLA influenciam na expressão e ativação de MMPs. Os dois sistemas proteolíticos do hospedeiro são desregulados para atuar em benefício da disseminação das leptospiros. E, uma vez ativados, esses sistemas interagem, exacerbando ainda mais a ativação de proteólise no hospedeiro.

O entendimento de funções específicas da PLA durante as infecções bacterianas pode ser crítico para o desenvolvimento de novas terapias e vacinas. Com base no que foi apresentado, é possível afirmar que a interação com sistema proteolítico PLG/PLA deve ser importante durante o processo infeccioso e de invasão das leptospiros. Considerando-se a falta de conhecimento sobre a patogênese da leptospirose, os dados resultantes desta tese constituem um avanço na compreensão da patogenicidade e virulência das leptospiros. Acredita-se que essa nova característica seja de grande contribuição para o conhecimento dos aspectos moleculares do processo infeccioso e patogenicidade dessas bactérias e que possa colaborar na identificação de proteínas com papel na patogenicidade e, assim, antígenos em potencial para o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra a leptospirose.



## REFERÊNCIAS\*

- Adler B e De la Pena Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010.140 (3-4): 287-296.
- Ahmad SN, Shah S e Ahmad FM. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *J Postgrad Med.* 2005.51 (3): 195-200.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW e Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990.215 (3): 403-410.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W e Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997.25 (17): 3389-3402.
- Amalinei C, Caruntu ID, Giusca SE e Balan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol.* 2010.51 (2): 215-228.
- Andrews NC. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet.* 2000.1 (3): 208-217.
- Antonara S, Ristow L e Coburn J. Adhesion mechanisms of *Borrelia burgdorferi*. *Adv Exp Med Biol.* 2011.715 35-49.
- Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T e Riley LW. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science.* 1993.261 (5127): 1454-1457.
- Attali C, Frolet C, Durmort C, Offant J, Vernet T e Di Guilmi AM. *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix. *Infect Immun.* 2008.76 (2): 466-476.
- Atzingen MV, Barbosa AS, De Brito T, Vasconcellos SA, de Moraes ZM, Lima DM, Abreu PA e Nascimento AL. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC Microbiol.* 2008.8 70.
- Atzingen MV, Cerqueira GM, Vieira ML, Oliveira R, Oliveira TR, Domingos RF, Barros AT, Mendes RS e Nascimento ALTO (2010a). Identification and Characterization of Novel Adhesins in *Leptospira*. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* Vilas AM, Formatex Research Center. 1: 704-713.
- Atzingen MV, Goncales AP, de Moraes ZM, Araujo ER, De Brito T, Vasconcellos SA e Nascimento AL. Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with *Leptospira interrogans*. *J Med Microbiol.* 2010b.59 (Pt 9): 1005-1015.
- Baker MF e Baker HJ. Pathogenic *Leptospira* in Malaysian surface waters. I. A method of survey for *Leptospira* in natural waters and soils. *Am J Trop Med Hyg.* 1970.19 (3): 485-492.

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2011 Jul 15]

- Banfi E, Cinco M, Bellini M e Soranzo MR. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospire. *J Gen Microbiol.* 1982.128 (4): 813-816.
- Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, Atzingen MV, Watanabe MM, Vieira ML, Morais ZM, Vasconcellos SA e Nascimento AL. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infect Immun.* 2006.74 (11): 6356-6364.
- Barbosa AS, Abreu PA, Vasconcellos SA, Morais ZM, Goncales AP, Silva AS, Daha MR e Isaac L. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect Immun.* 2009.77 (3): 1137-1143.
- Barocchi MA, Ko AI, Ferrer SR, Faria MT, Reis MG e Riley LW. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J Clin Microbiol.* 2001.39 (1): 191-195.
- Barocchi MA, Ko AI, Reis MG, McDonald KL e Riley LW. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect Immun.* 2002.70 (12): 6926-6932.
- Behera AK, Hildebrand E, Scagliotti J, Steere AC e Hu LT. Induction of host matrix metalloproteinases by *Borrelia burgdorferi* differs in human and murine lyme arthritis. *Infect Immun.* 2005.73 (1): 126-134.
- Bergmann S e Hammerschmidt S. Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost.* 2007.98 (3): 512-520.
- Bergmann S, Rohde M, Chhatwal GS e Hammerschmidt S. alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol.* 2001.40 (6): 1273-1287.
- Bergmann S, Rohde M, Chhatwal GS e Hammerschmidt S. Characterization of plasmin(ogen) binding to *Streptococcus pneumoniae*. *Indian J Med Res.* 2004.119 Suppl 29-32.
- Bergmann S, Rohde M, Preissner KT e Hammerschmidt S. The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thromb Haemost.* 2005.94 (2): 304-311.
- Bharadwaj R, Bal AM, Joshi SA, Kagal A, Pol SS, Garad G, Arjunwadkar V e Katti R. An urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India. *Jpn J Infect Dis.* 2002.55 (6): 194-196.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM e Peru-United States Leptospirosis C. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003.3 (12): 757-771.
- Blom AM, Hallstrom T e Riesbeck K. Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond. *Mol Immunol.* 2009.46 (14): 2808-2817.
- Bolin CA e Koellner P. Human-to-human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. *J Infect Dis.* 1988.158 (1): 246-247.

- Bonazzi M e Cossart P. Impenetrable barriers or entry portals? The role of cell-cell adhesion during infection. *J Cell Biol.* 2011.195 (3): 349-358.
- Bourhy P, Louvel H, Saint Girons I e Picardeau M. Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a mariner transposon. *J Bacteriol.* 2005.187 (9): 3255-3258.
- Boyle EC e Finlay BB. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. *Curr Opin Cell Biol.* 2003.15 (5): 633-639.
- Branger C, Chatrenet B, Gauvrit A, Aviat F, Aubert A, Bach JM e Andre-Fontaine G. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infect Immun.* 2005.73 (7): 4062-4069.
- Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, Andre-Fontaine G e Eloit M. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immun.* 2001.69 (11): 6831-6838.
- Brauer R, Beck IM, Roderfeld M, Roeb E e Sedlacek R. Matrix metalloproteinase-19 inhibits growth of endothelial cells by generating angiostatin-like fragments from plasminogen. *BMC Biochem.* 2011.12 38.
- Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC e Weyant RS. 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. *Int J Syst Bacteriol.* 1999.49 Pt 2 839-858.
- Brinckerhoff CE e Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002.3 (3): 207-214.
- Brissette CA, Haupt K, Barthel D, Cooley AE, Bowman A, Skerka C, Wallich R, Zipfel PF, Kraiczy P e Stevenson B. *Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. *Infect Immun.* 2009.77 (1): 300-306.
- Brown EL, Guo BP, O'Neal P e Hook M. Adherence of *Borrelia burgdorferi*. Identification of critical lysine residues in DbpA required for decorin binding. *J Biol Chem.* 1999.274 (37): 26272-26278.
- Bulach DM, Kalambaheti T, de la Pena-Moctezuma A e Adler B. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2000.2 (4): 375-380.
- Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK e Adler B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006.103 (39): 14560-14565.
- Cai G, Chen X, Fu B e Lu Y. Activation of gelatinases by fibrin is PA/plasmin system-dependent in human glomerular endothelial cells. *Mol Cell Biochem.* 2005.277 (1-2): 171-179.

Cameron CE. Identification of a *Treponema pallidum* laminin-binding protein. *Infect Immun*. 2003.71 (5): 2525-2533.

Cameron CE, Brouwer NL, Tisch LM e Kuroiwa JM. Defining the interaction of the *Treponema pallidum* adhesin Tp0751 with laminin. *Infect Immun*. 2005.73 (11): 7485-7494.

Cameron CE, Brown EL, Kuroiwa JM, Schnapp LM e Brouwer NL. *Treponema pallidum* fibronectin-binding proteins. *J Bacteriol*. 2004.186 (20): 7019-7022.

Candela M, Biagi E, Centanni M, Turrone S, Vici M, Musiani F, Vitali B, Bergmann S, Hammerschmidt S e Brigidi P. Bifidobacterial enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host. *Microbiology*. 2009.155 (Pt 10): 3294-3303.

Candela M, Miccoli G, Bergmann S, Turrone S, Vitali B, Hammerschmidt S e Brigidi P. Plasminogen-dependent proteolytic activity in *Bifidobacterium lactis*. *Microbiology*. 2008.154 (Pt 8): 2457-2462.

Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB, Monaris D, Abreu PA, Strobel S, Jozsi M, Isaac L e Barbosa AS. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *J Infect Dis*. 2012.205 (6): 995-1004.

Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A e Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem*. 2003.253 (1-2): 269-285.

Charon NW e Goldstein SF. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu Rev Genet*. 2002.36 47-73.

Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J e Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun*. 2007.75 (5): 2441-2450.

Cinco M. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. *New Microbiol*. 2010.33 (4): 283-292.

Cinco M e Banfi E. Activation of complement by leptospires and its bactericidal activity. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 1983.254 (2): 261-265.

Cinco M, Banfi E e Soranzo MR. Studies on the interaction between macrophages and leptospires. *J Gen Microbiol*. 1981.124 (2): 409-413.

Cinco M, Banfi E e Soranzo MR. Leptospires macrophage interactions. *Adv Exp Med Biol*. 1982.141 167-174.

Coleman JL e Benach JL. The generation of enzymatically active plasmin on the surface of spirochetes. *Methods*. 2000.21 (2): 133-141.

Coleman JL, Gebbia JA e Benach JL. *Borrelia burgdorferi* and other bacterial products induce expression and release of the urokinase receptor (CD87). *J Immunol*. 2001.166 (1): 473-480.

- Coleman JL, Gebbia JA, Piesman J, Degen JL, Bugge TH e Benach JL. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell*. 1997.89 (7): 1111-1119.
- Coleman JL, Roemer EJ e Benach JL. Plasmin-coated borrelia *Burgdorferi* degrades soluble and insoluble components of the mammalian extracellular matrix. *Infect Immun*. 1999.67 (8): 3929-3936.
- Coleman JL, Sellati TJ, Testa JE, Kew RR, Furie MB e Benach JL. *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infect Immun*. 1995.63 (7): 2478-2484.
- Collen D e Lijnen HR. Thrombolytic agents. *Thromb Haemost*. 2005.93 (4): 627-630.
- Colman RW, Sartor RB, Adam AA, DeLa Cadena RA e Stadnicki A. The plasma kallikrein-kinin system in sepsis, inflammatory arthritis, and enterocolitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 1998.16 (4): 365-384.
- Crane DD, Warner SL e Bosio CM. A novel role for plasmin-mediated degradation of opsonizing antibody in the evasion of host immunity by virulent, but not attenuated, *Francisella tularensis*. *J Immunol*. 2009.183 (7): 4593-4600.
- Croda J, Figueira CP, Wunder EA, Jr., Santos CS, Reis MG, Ko AI e Picardeau M. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the *LigB* gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. *Infect Immun*. 2008.76 (12): 5826-5833.
- Cullen PA, Haake DA e Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Rev*. 2004.28 (3): 291-318.
- de la Pena-Moctezuma A, Bulach DM, Kalambaheti T e Adler B. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. *FEMS Microbiol Lett*. 1999.177 (2): 319-326.
- Degen JL, Bugge TH e Goguen JD. Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense. *J Thromb Haemost*. 2007.5 Suppl 1 24-31.
- Dikken H, Kmety E, de Geus A, Adinarayanan N e Timmer VE. Two new leptospira serovars belonging to the Hebdomadis serogroup. *Trop Geogr Med*. 1978.30 (4): 537-542.
- Domingos RF, Vieira ML, Romero EC, Goncales AP, Morais ZM, Vasconcellos SA e Nascimento AL. Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions. *BMC Microbiol*. 2012.12 (1): 50.
- Egea L, Aguilera L, Gimenez R, Sorolla MA, Aguilar J, Badia J e Baldoma L. Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007.39 (6): 1190-1203.
- Elkington PT, O'Kane CM e Friedland JS. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol*. 2005.142 (1): 12-20.

Faine S, Adler B, Bolin C e Perolat P (1999). *Leptospira* and Leptospirosis. Melbourne, Australia, MediSci.

Farr RW. Leptospirosis. *Clin Infect Dis*. 1995.21 (1): 1-6; quiz 7-8.

Fenno JC, Tamura M, Hannam PM, Wong GW, Chan RA e McBride BC. Identification of a *Treponema denticola* OppA homologue that binds host proteins present in the subgingival environment. *Infect Immun*. 2000.68 (4): 1884-1892.

Finn RD, Mistry J, Schuster-Bockler B, Griffiths-Jones S, Hollich V, Lassmann T, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Durbin R, Eddy SR, Sonnhammer EL e Bateman A. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res*. 2006.34 (Database issue): D247-251.

FIOCRUZ. (2010). Acessado em 05 junho, 2012. Disponível no endereço <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=1110&sid=9&tpl=printerview>.

Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, Ferreira AG, Riley LW, Reis MG, Haake DA e Ko AI. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2001.39 (9): 3303-3310.

Floden AM, Watt JA e Brissette CA. *Borrelia burgdorferi* enolase is a surface-exposed plasminogen binding protein. *PLoS One*. 2011.6 (11): e27502.

Fonseca Cde A, Teixeira MM, Romero EC, Tengan FM, Silva MV e Shikanai-Yasuda MA. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. *J Infect*. 2006.52 (1): 15-22.

Gaibani P, Caroli F, Nucci C e Sambri V. Major surface protein complex of *Treponema denticola* induces the production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6 and matrix metalloproteinase 9 by primary human peripheral blood monocytes. *J Periodontal Res*. 2010.45 (3): 361-366.

Gamberini M, Gomez RM, Atzingen MV, Martins EA, Vasconcellos SA, Romero EC, Leite LC, Ho PL e Nascimento AL. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett*. 2005.244 (2): 305-313.

Gebbia JA, Coleman JL e Benach JL. *Borrelia spirochetes* upregulate release and activation of matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) and collagenase 1 (MMP-1) in human cells. *Infect Immun*. 2001.69 (1): 456-462.

Gebbia JA, Coleman JL e Benach JL. Selective induction of matrix metalloproteinases by *Borrelia burgdorferi* via toll-like receptor 2 in monocytes. *J Infect Dis*. 2004.189 (1): 113-119.

Goldstein SF, Charon NW e Kreiling JA. *Borrelia burgdorferi* swims with a planar waveform similar to that of eukaryotic flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994.91 (8): 3433-3437.

Gomez RM, Vieira ML, Schattner M, Malaver E, Watanabe MM, Barbosa AS, Abreu PA, de Moraes ZM, Cifuentes JO, Atzingen MV, Oliveira TR, Vasconcellos SA e Nascimento AL. Putative outer membrane proteins of *Leptospira interrogans* stimulate human umbilical vein

- endothelial cells (HUVECS) and express during infection. *Microb Pathog.* 2008.45 (5-6): 315-322.
- Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho AL, Aires TS, Villasboas-Bisneto JC, Queirroz A, Santos AC, Salgado K, Reis MG e Ko AI. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2008.14 (3): 505-508.
- Guan SM, He JJ, Zhang M e Shu L. *Prevotella intermedia* stimulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-2 expression via multiple signaling pathways in human periodontal ligament cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011.62 (1): 91-100.
- Guo BP, Brown EL, Dorward DW, Rosenberg LC e Hook M. Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.* 1998.30 (4): 711-723.
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN e Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun.* 2000.68 (4): 2276-2285.
- Haake DA, Dundoo M, Cader R, Kubak BM, Hartskeerl RA, Sejvar JJ e Ashford DA. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. *Clin Infect Dis.* 2002.34 (9): e40-43.
- Haake DA e Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun.* 2002.70 (9): 4936-4945.
- Haake DA e Matsunaga J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. *Mol Microbiol.* 2010.
- Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J e Wagar EA. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun.* 1999.67 (12): 6572-6582.
- Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller MN e Lovett MA. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. *Infect Immun.* 1991.59 (3): 1131-1140.
- Haile WB, Coleman JL e Benach JL. Reciprocal upregulation of urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-2, by *Borrelia burgdorferi* affects bacterial penetration and host-inflammatory response. *Cell Microbiol.* 2006.8 (8): 1349-1360.
- Harpel PC, Sullivan R e Chang TS. Binding and activation of plasminogen on immobilized immunoglobulin G. Identification of the plasmin-derived Fab as the plasminogen-binding fragment. *J Biol Chem.* 1989.264 (1): 616-624.
- Hartskeerl RA, Collares-Pereira M e Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect.* 2011.17 (4): 494-501.
- Hauk P, Macedo F, Romero EC, Vasconcellos SA, de Morais ZM, Barbosa AS e Ho PL. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect Immun.* 2008.76 (6): 2642-2650.

- Heilpern AJ, Wertheim W, He J, Perides G, Bronson RT e Hu LT. Matrix metalloproteinase 9 plays a key role in lyme arthritis but not in dissemination of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*. 2009.77 (7): 2643-2649.
- Herwald H, Morgelin M, Olsen A, Rhen M, Dahlback B, Muller-Esterl W e Bjorck L. Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces--a clue to serious complications in infectious diseases. *Nat Med*. 1998.4 (3): 298-302.
- Hoke DE, Egan S, Cullen PA e Adler B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect Immun*. 2008.76 (5): 2063-2069.
- Hu LT, Eskildsen MA, Masgala C, Steere AC, Arner EC, Pratta MA, Grodzinsky AJ, Loening A e Perides G. Host metalloproteinases in Lyme arthritis. *Arthritis Rheum*. 2001.44 (6): 1401-1410.
- Hua H, Li M, Luo T, Yin Y e Jiang Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cell Mol Life Sci*. 2011.68 (23): 3853-3868.
- Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC e Yeh TM. Tissue plasminogen activator induced by dengue virus infection of human endothelial cells. *J Med Virol*. 2003.70 (4): 610-616.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG e Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973.52 (11): 2745-2756.
- Jobin MC, Brassard J, Quessy S, Gottschalk M e Grenier D. Acquisition of host plasmin activity by the Swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun*. 2004.72 (1): 606-610.
- Johnsen LB, Poulsen K, Kilian M e Petersen TE. Purification and cloning of a streptokinase from *Streptococcus uberis*. *Infect Immun*. 1999.67 (3): 1072-1078.
- Juncker AS, Willenbrock H, Von Heijne G, Brunak S, Nielsen H e Krogh A. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci*. 2003.12 (8): 1652-1662.
- Kinnby B, Booth NA e Svensater G. Plasminogen binding by oral streptococci from dental plaque and inflammatory lesions. *Microbiology*. 2008.154 (Pt 3): 924-931.
- Knaust A, Weber MV, Hammerschmidt S, Bergmann S, Frosch M e Kurzai O. Cytosolic proteins contribute to surface plasminogen recruitment of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol*. 2007.189 (8): 3246-3255.
- Knipe L, Meli A, Hewlett L, Bierings R, Dempster J, Skehel P, Hannah MJ e Carter T. A revised model for the secretion of tPA and cytokines from cultured endothelial cells. *Blood*. 2010.116 (12): 2183-2191.
- Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD, Jr. e Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet*. 1999.354 (9181): 820-825.



Kunert A, Losse J, Gruszyn C, Huhn M, Kaendler K, Mikkat S, Volke D, Hoffmann R, Jokiranta TS, Seeberger H, Moellmann U, Hellwage J e Zipfel PF. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J Immunol.* 2007.179 (5): 2979-2988.

Kuyvenhoven JP, Molenaar IQ, Verspaget HW, Veldman MG, Palareti G, Legnani C, Moolenburgh SE, Terpstra OT, Lamers CB, van Hoek B e Porte RJ. Plasma MMP-2 and MMP-9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 during human orthotopic liver transplantation. The effect of aprotinin and the relation to ischemia/reperfusion injury. *Thromb Haemost.* 2004.91 (3): 506-513.

Lagal V, Portnoi D, Faure G, Postic D e Baranton G. *Borrelia burgdorferi sensu stricto* invasiveness is correlated with OspC-plasminogen affinity. *Microbes Infect.* 2006.8 (3): 645-652.

Lahteenmaki K, Edelman S e Korhonen TK. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol.* 2005.13 (2): 79-85.

Lahteenmaki K, Kuusela P e Korhonen TK. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev.* 2001.25 (5): 531-552.

Lambert A, Picardeau M, Haake DA, Sermswan RW, Srikram A, Adler B e Murray G. FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence, but not required for the formation of flagella sheath. *Infect Immun.* 2012.

Lambris JD, Ricklin D e Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2008.6 (2): 132-142.

Ledoux D, Papy-Garcia D, Escartin Q, Sagot MA, Cao Y, Barritault D, Courtois J, Hornebeck W e Caruelle JP. Human plasmin enzymatic activity is inhibited by chemically modified dextrans. *J Biol Chem.* 2000.275 (38): 29383-29390.

Leigh JA. Purification of a plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol Lett.* 1994.118 (1-2): 153-158.

Leigh JA, Hodgkinson SM e Lincoln RA. The interaction of *Streptococcus dysgalactiae* with plasmin and plasminogen. *Vet Microbiol.* 1998.61 (1-2): 121-135.

Letunic I, Copley RR, Pils B, Pinkert S, Schultz J e Bork P. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res.* 2006.34 (Database issue): D257-260.

Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001.14 (2): 296-326.

Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 2003.36 (4): 447-452.

Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG e Mayer LW. Detection of pathogenic leptospire by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 2005.54 (Pt 1): 45-49.

Lewalle JM, Munaut C, Pichot B, Cataldo D, Baramova E e Foidart JM. Plasma membrane-dependent activation of gelatinase A in human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1995.165 (3): 475-483.

- Leytus SP, Bowles LK, Konisky J e Mangel WF. Activation of plasminogen to plasmin by a protease associated with the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981.78 (3): 1485-1489.
- Li L, Ojcius DM e Yan J. Comparison of invasion of fibroblasts and macrophages by high- and low-virulence *Leptospira* strains: colonization of the host-cell nucleus and induction of necrosis by the virulent strain. *Arch Microbiol*. 2007.188 (6): 591-598.
- Li S, Ojcius DM, Liao S, Li L, Xue F, Dong H e Yan J. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. *Innate Immun*. 2010.16 (2): 80-92.
- Li Z, Ploplis VA, French EL e Boyle MD. Interaction between group A streptococci and the plasmin(ogen) system promotes virulence in a mouse skin infection model. *J Infect Dis*. 1999.179 (4): 907-914.
- Lijnen HR. Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci*. 2001.936 226-236.
- Lijnen HR. Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Mosc)*. 2002.67 (1): 92-98.
- Lijnen HR, De Cock F, Van Hoef B, Schlott B e Collen D. Characterization of the interaction between plasminogen and staphylokinase. *Eur J Biochem*. 1994.224 (1): 143-149.
- Lijnen HR, Ugwu F, Bini A e Collen D. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry*. 1998.37 (14): 4699-4702.
- Lin YP, Greenwood A, Yan W, Nicholson LK, Sharma Y, McDonough SP e Chang YF. A novel fibronectin type III module binding motif identified on C-terminus of *Leptospira* immunoglobulin-like protein, LigB. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009.389 (1): 57-62.
- Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V e Garbisa S. Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res*. 1981a.41 (11 Pt 1): 4629-4636.
- Liotta LA, Goldfarb RH e Terranova VP. Cleavage of laminin by thrombin and plasmin: alpha thrombin selectively cleaves the beta chain of laminin. *Thromb Res*. 1981b.21 (6): 663-673.
- Liu Y, Zheng W, Li L, Mao Y e Yan J. Pathogenesis of leptospirosis: interaction of *Leptospira interrogans* with in vitro cultured mammalian cells. *Med Microbiol Immunol*. 2007.196 (4): 233-239.
- Livak KJ e Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001.25 (4): 402-408.
- Lo M, Bulach DM, Powell DR, Haake DA, Matsunaga J, Paustian ML, Zuerner RL e Adler B. Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. *Infect Immun*. 2006.74 (10): 5848-5859.

- Lo M, Murray GL, Khoo CA, Haake DA, Zuerner RL e Adler B. Transcriptional response of *Leptospira interrogans* to iron limitation and characterization of a PerR homolog. *Infect Immun*. 2010.78 (11): 4850-4859.
- Lomar AV, Diament D e Torres JR. Leptospirosis in Latin America. *Infect Dis Clin North Am*. 2000.14 (1): 23-39, vii-viii.
- Longhi MT, Oliveira TR, Romero EC, Goncales AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA e Nascimento AL. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. *J Med Microbiol*. 2009.58 (Pt 10): 1275-1282.
- Magalhaes V, Veiga-Malta I, Almeida MR, Baptista M, Ribeiro A, Trieu-Cuot P e Ferreira P. Interaction with human plasminogen system turns on proteolytic activity in *Streptococcus agalactiae* and enhances its virulence in a mouse model. *Microbes Infect*. 2007.9 (11): 1276-1284.
- Malmstrom J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW e Aebersold R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature*. 2009.460 (7256): 762-765.
- Martinez R, Perez A, Quinones Mdel C, Cruz R, Alvarez A, Armesto M, Fernandez C, Menendez J, Rodriguez I, Baro M, Diaz M, Rodriguez J, Sierra G, Obregon AM, Toledo ME e Fernandez N. [Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba]. *Rev Panam Salud Publica*. 2004.15 (4): 249-255.
- Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, Bolin CA, Reis MG, Riley LW, Haake DA e Ko AI. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol*. 2003.49 (4): 929-945.
- Matsunaga J, Lo M, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B e Haake DA. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. *Infect Immun*. 2007.75 (6): 2864-2874.
- Matsunaga J, Sanchez Y, Xu X e Haake DA. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infect Immun*. 2005.73 (1): 70-78.
- Matta SK, Agarwal S e Bhatnagar R. Surface localized and extracellular Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Bacillus anthracis* is a plasminogen binding protein. *Biochim Biophys Acta*. 2010.1804 (11): 2111-2120.
- Mavrommatis AC, Theodoridis T, Economou M, Kotanidou A, El Ali M, Christopoulou-Kokkinou V e Zakyntinos SG. Activation of the fibrinolytic system and utilization of the coagulation inhibitors in sepsis: comparison with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*. 2001.27 (12): 1853-1859.
- McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG e Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2005.18 (5): 376-386.

- McCoy HE, Broder CC e Lottenberg R. Streptokinases produced by pathogenic group C streptococci demonstrate species-specific plasminogen activation. *J Infect Dis.* 1991.164 (3): 515-521.
- Meites E, Jay MT, Deresinski S, Shieh WJ, Zaki SR, Tompkins L e Smith DS. Reemerging leptospirosis, California. *Emerg Infect Dis.* 2004.10 (3): 406-412.
- Mekalanos JJ. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol.* 1992.174 (1): 1-7.
- Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S e Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospire. *Microb Pathog.* 2005.39 (4): 139-147.
- Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G e Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1992.30 (9): 2219-2224.
- Merien F, Baranton G e Perolat P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect Immun.* 1997.65 (2): 729-738.
- Miao D, Fenno JC, Timm JC, Joo NE e Kapila YL. The *Treponema denticola* chymotrypsin-like protease dentilisin induces matrix metalloproteinase-2-dependent fibronectin fragmentation in periodontal ligament cells. *Infect Immun.* 2011.79 (2): 806-811.
- Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol.* 2011.12 (11): 233.
- Murray GL, Morel V, Cerqueira GM, Croda J, Srikrum A, Henry R, Ko AI, Dellagostin OA, Bulach DM, Sermswan RW, Adler B e Picardeau M. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun.* 2009a.77 (2): 810-816.
- Murray GL, Srikrum A, Henry R, Hartskeerl RA, Sermswan RW e Adler B. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol Microbiol.* 2010.78 (3): 701-709.
- Murray GL, Srikrum A, Henry R, Puapairoj A, Sermswan RW e Adler B. *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. *Microbes Infect.* 2009b.11 (2): 311-314.
- Murray GL, Srikrum A, Hoke DE, Wunder EA, Jr., Henry R, Lo M, Zhang K, Sermswan RW, Ko AI e Adler B. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* 2009c.77 (3): 952-958.
- Nahori MA, Fournie-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M, Raetz CR, Saint Girons I e Werts C. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol.* 2005.175 (9): 6022-6031.
- Nakai K e Horton P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci.* 1999.24 (1): 34-36.
- Nakai K e Kanehisa M. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins.* 1991.11 (2): 95-110.

- Nally JE, Artiushin S e Timoney JF. Molecular characterization of thermoinduced immunogenic proteins Q1p42 and Hsp15 of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*. 2001.69 (12): 7616-7624.
- Nally JE, Whitelegge JP, Bassilian S, Blanco DR e Lovett MA. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. *Infect Immun*. 2007.75 (2): 766-773.
- Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MV, Oliveira MC, Menck CF, Leite LC, Carrer H, Coutinho LL, Degraeve WM, Dellagostin OA, El-Dorry H, Ferro ES, Ferro MI, Furlan LR, Gamberini M, Giglioti EA, Goes-Neto A, Goldman GH, Goldman MH, Harakava R, Jeronimo SM, Junqueira-de-Azevedo IL, Kimura ET, Kuramae EE, Lemos EG, Lemos MV, Marino CL, Nunes LR, de Oliveira RC, Pereira GG, Reis MS, Schriefer A, Siqueira WJ, Sommer P, Tsai SM, Simpson AJ, Ferro JA, Camargo LE, Kitajima JP, Setubal JC e Van Sluys MA. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol*. 2004a.186 (7): 2164-2172.
- Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Digiampietri LA, Harstkeerl RA, Ho PL, Marques MV, Oliveira MC, Setubal JC, Haake DA e Martins EA. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz J Med Biol Res*. 2004b.37 (4): 459-477.
- Neves FO, Abreu PA, Vasconcellos SA, de Moraes ZM, Romero EC e Nascimento AL. Identification of a novel potential antigen for early-phase serodiagnosis of leptospirosis. *Arch Microbiol*. 2007.188 (5): 523-532.
- Nogueira SV, Fonseca FL, Rodrigues ML, Mundodi V, Abi-Chacra EA, Winters MS, Alderete JF e de Almeida Soares CM. Paracoccidioides brasiliensis enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infect Immun*. 2010.78 (9): 4040-4050.
- Nowicki ST, Minning-Wenz D, Johnston KH e Lottenberg R. Characterization of a novel streptokinase produced by *Streptococcus equisimilis* of non-human origin. *Thromb Haemost*. 1994.72 (4): 595-603.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Cao Y, Moses M, Lane WS, Sage EH e Folkman J. Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994.59 471-482.
- Okada K, Ueshima S, Takaishi T, Yuasa H, Fukao H e Matsuo O. Effects of fibrin and alpha2-antiplasmin on plasminogen activation by staphylokinase. *Am J Hematol*. 1996.53 (3): 151-157.
- Oliveira R, de Moraes ZM, Goncalves AP, Romero EC, Vasconcellos SA e Nascimento AL. Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PLoS One*. 2011.6 (7): e21962.
- Oliveira TR, Longhi MT, de Moraes ZM, Romero EC, Blanco RM, Kirchgatter K, Vasconcellos SA e Nascimento AL. Evaluation of leptospiral recombinant antigens MPL17 and MPL21 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin Vaccine Immunol*. 2008.15 (11): 1715-1722.

Oliveira TR, Longhi MT, Goncales AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA e Nascimento AL. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. *Microbes Infect.* 2010.12 (3): 207-217.

Oliver JJ, Webb DJ e Newby DE. Stimulated tissue plasminogen activator release as a marker of endothelial function in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005.25 (12): 2470-2479.

Orgel D, Schroder W, Hecker-Kia A, Weithmann KU, Kolkenbrock H e Ulbrich N. The cleavage of pro-urokinase type plasminogen activator by stromelysin-1. *Clin Chem Lab Med.* 1998.36 (9): 697-702.

Palaniappan RU, McDonough SP, Divers TJ, Chen CS, Pan MJ, Matsumoto M e Chang YF. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. *Infect Immun.* 2006.74 (3): 1745-1750.

Pantzar M, Ljungh A e Wadstrom T. Plasminogen binding and activation at the surface of *Helicobacter pylori* CCUG 17874. *Infect Immun.* 1998.66 (10): 4976-4980.

Patarakul K, Lo M e Adler B. Global transcriptomic response of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni upon exposure to serum. *BMC Microbiol.* 2010.10 31.

Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Riley PF e Reynolds EC. Characterization of proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology.* 2006.152 (Pt 8): 2381-2394.

Patterson BC e Sang QA. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem.* 1997.272 (46): 28823-28825.

Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM e Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 1999.20 (18): 3551-3567.

Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, Creno S, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC, McGrath A, Johnson MJ, Boursaux-Eude C, Seemann T, Rouy Z, Coppel RL, Rood JI, Lajus A, Davies JK, Medigue C e Adler B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One.* 2008.3 (2): e1607.

Pizarro-Cerda J e Cossart P. Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *J Pathol.* 2006.208 (2): 215-223.

Plank R e Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect.* 2000.2 (10): 1265-1276.

Pozzi A, Moberg PE, Miles LA, Wagner S, Soloway P e Gardner HA. Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000.97 (5): 2202-2207.

Probert WS e Johnson BJ. Identification of a 47 kDa fibronectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolate B31. *Mol Microbiol.* 1998.30 (5): 1003-1015.

- Probert WS, Kim JH, Hook M e Johnson BJ. Mapping the ligand-binding region of *Borrelia burgdorferi* fibronectin-binding protein BBK32. *Infect Immun*. 2001.69 (6): 4129-4133.
- Qin JH, Sheng YY, Zhang ZM, Shi YZ, He P, Hu BY, Yang Y, Liu SG, Zhao GP e Guo XK. Genome-wide transcriptional analysis of temperature shift in *L. interrogans* serovar lai strain 56601. *BMC Microbiol*. 2006.6 51.
- Que-Gewirth NL, Ribeiro AA, Kalb SR, Cotter RJ, Bulach DM, Adler B, Girons IS, Werts C e Raetz CR. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *leptospira interrogans* lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. *J Biol Chem*. 2004.279 (24): 25420-25429.
- Ra HJ e Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol*. 2007.26 (8): 587-596.
- Ram M, Sherer Y e Shoenfeld Y. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *J Clin Immunol*. 2006.26 (4): 299-307.
- Ratel D, Mihoubi S, Beaulieu E, Durocher Y, Rivard GE, Gingras D e Beliveau R. VEGF increases the fibrinolytic activity of endothelial cells within fibrin matrices: involvement of VEGFR-2, tissue type plasminogen activator and matrix metalloproteinases. *Thromb Res*. 2007.121 (2): 203-212.
- Rautemaa R e Meri S. Complement-resistance mechanisms of bacteria. *Microbes Infect*. 1999.1 (10): 785-794.
- Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RD, Santana FS, Mohr S, Melendez AX, Queiroz A, Santos AC, Ravines RR, Tassinari WS, Carvalho MS, Reis MG e Ko AI. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008.2 (4): e228.
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG e Zhao GP. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2003.422 (6934): 888-893.
- Ristow P, Bourhy P, da Cruz McBride FW, Figueira CP, Huerre M, Ave P, Girons IS, Ko AI e Picardeau M. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog*. 2007.3 (7): e97.
- Rojas M, Labrador I, Concepcion JL, Aldana E e Avilan L. Characteristics of plasminogen binding to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Acta Trop*. 2008.107 (1): 54-58.
- Rooijackers SH e van Strijp JA. Bacterial complement evasion. *Mol Immunol*. 2007.44 (1-3): 23-32.
- Rooijackers SH, van Wamel WJ, Ruyken M, van Kessel KP e van Strijp JA. Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes Infect*. 2005.7 (3): 476-484.

- Rossmann E, Kraiczy P, Herzberger P, Skerka C, Kirschfink M, Simon MM, Zipfel PF e Wallich R. Dual binding specificity of a *Borrelia hermsii*-associated complement regulator-acquiring surface protein for factor H and plasminogen discloses a putative virulence factor of relapsing fever spirochetes. *J Immunol.* 2007.178 (11): 7292-7301.
- Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996.12 697-715.
- Salo T, Lyons JG, Rahemtulla F, Birkedal-Hansen H e Larjava H. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes. *J Biol Chem.* 1991.266 (18): 11436-11441.
- Sang QX. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res.* 1998.8 (3): 171-177.
- Sato Y, Uemura T, Morimitsu K, Sato-Nishiuchi R, Manabe R, Takagi J, Yamada M e Sekiguchi K. Molecular basis of the recognition of nephronectin by integrin alpha8beta1. *J Biol Chem.* 2009.284 (21): 14524-14536.
- Sbardella D, Fasciglione GF, Gioia M, Ciaccio C, Tundo GR, Marini S e Coletta M. Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. *Mol Aspects Med.* 2012.33 (2): 119-208.
- Schlott B, Guhrs KH, Hartmann M, Rocker A e Collen D. NH2-terminal structural motifs in staphylokinase required for plasminogen activation. *J Biol Chem.* 1998.273 (35): 22346-22350.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P e Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998.95 (11): 5857-5864.
- Senaratne RH, Sidders B, Sequeira P, Saunders G, Dunphy K, Marjanovic O, Reader JR, Lima P, Chan S, Kendall S, McFadden J e Riley LW. *Mycobacterium tuberculosis* strains disrupted in *mce3* and *mce4* operons are attenuated in mice. *J Med Microbiol.* 2008.57 (Pt 2): 164-170.
- Severi E, Hood DW e Thomas GH. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology.* 2007.153 (Pt 9): 2817-2822.
- Seya T, Nagasawa S, Matsukura M, Hasegawa H e Atkinson JP. Generation of C3d,g and C3d by urokinase-treated plasma in association with fibrinolysis. *Complement.* 1985.2 (2-3): 165-174.
- Sheldon IM e Dobson H. Reproductive challenges facing the cattle industry at the beginning of the 21st century. *Reprod Suppl.* 2003.61 1-13.
- Siemens N, Patenge N, Otto J, Fiedler T e Kreikemeyer B. *Streptococcus pyogenes* M49 plasminogen/plasmin binding facilitates keratinocyte invasion via integrin-integrin-linked kinase (ILK) pathways and protects from macrophage killing. *J Biol Chem.* 2011.286 (24): 21612-21622.
- SINAN/CVE/CCD/SES-SP. Acessado em 05 junho, 2012. Disponível no endereço [http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/zoo/LEPTO\\_GVE11.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/zoo/LEPTO_GVE11.htm).



- SINAN/SVS/MS. Acessado em 05 junho, 2012. Disponível no endereço [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos\\_lepto\\_25\\_05\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_lepto_25_05_11.pdf).
- Snoek-van Beurden PA e Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*. 2005.38 (1): 73-83.
- Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y e Goguen JD. A surface protease and the invasive character of plague. *Science*. 1992.258 (5084): 1004-1007.
- Stanworth DR e Turner MW (1986). Immunochemical analysis of human and rabbit immunoglobulins and their subunits. *Handbook of experimental immunology*. DM W. London, UK., Blackwell Scientific: 12.11e12.45.
- Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Miller MC, Demoll E, Kraiczy P, Cooley AE, Creamer TP, Suchard MA, Brissette CA, Verma A e Haake DA. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS One*. 2007.2 (11): e1188.
- Stie J, Bruni G e Fox D. Surface-associated plasminogen binding of *Cryptococcus neoformans* promotes extracellular matrix invasion. *PLoS One*. 2009.4 (6): e5780.
- Sun H. The interaction between pathogens and the host coagulation system. *Physiology (Bethesda)*. 2006.21 281-288.
- Suomalainen M, Haiko J, Ramu P, Lobo L, Kukkonen M, Westerlund-Wikstrom B, Virkola R, Lahteenmaki K e Korhonen TK. Using every trick in the book: the Pla surface protease of *Yersinia pestis*. *Adv Exp Med Biol*. 2007.603 268-278.
- Thongboonkerd V. Proteomics in leptospirosis research: towards molecular diagnostics and vaccine development. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008.8 (1): 53-61.
- Toledo A, Coleman JL, Kuhlow CJ, Crowley JT e Benach JL. The enolase of *Borrelia burgdorferi* is a plasminogen receptor released in outer membrane vesicles. *Infect Immun*. 2012.80 (1): 359-368.
- Toyokawa T, Ohnishi M e Koizumi N. Diagnosis of acute leptospirosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011.9 (1): 111-121.
- Travis J, Potempa J e Maeda H. Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends Microbiol*. 1995.3 (10): 405-407.
- Travis J e Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem*. 1983.52 655-709.
- Ugwu F, Van Hoef B, Bini A, Collen D e Lijnen HR. Proteolytic cleavage of urokinase-type plasminogen activator by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry*. 1998.37 (20): 7231-7236.
- Urano T, Chibber BA e Castellino FJ. The reciprocal effects of epsilon-aminohexanoic acid and chloride ion on the activation of human [Glu1]plasminogen by human urokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987.84 (12): 4031-4034.

- Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA e Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2002.37 (6): 375-536.
- Verma A, Brissette CA, Bowman AA, Shah ST, Zipfel PF e Stevenson B. Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infect Immun.* 2010.78 (5): 2053-2059.
- Verma A, Hellwage J, Artiushin S, Zipfel PF, Kraiczy P, Timoney JF e Stevenson B. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* 2006.74 (5): 2659-2666.
- Vieira ML. Interação de *Leptospira interrogans* com o sistema proteolítico do plasminogênio/plasmina: análise, caracterização e possíveis implicações na infecção. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, Brasil, 2012.
- Vieira ML, Atzingen MV, Oliveira TR, Oliveira R, Andrade DM, Vasconcellos SA e Nascimento AL. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. *PLoS One.* 2010a.5 (6): e11259.
- Vieira ML, de Moraes ZM, Goncales AP, Romero EC, Vasconcellos SA e Nascimento AL. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. *J Infect.* 2010b.60 (1): 52-64.
- Vieira ML, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Romero EC e Nascimento AL. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. *Microb Pathog.* 2011.51 (5): 360-365.
- Vieira ML, Vasconcellos SA, Goncales AP, de Moraes ZM e Nascimento AL. Plasminogen acquisition and activation at the surface of leptospira species lead to fibronectin degradation. *Infect Immun.* 2009.77 (9): 4092-4101.
- Vinetz JM. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2001.14 (5): 527-538.
- Vinh T, Faine S e Adler B. Adhesion of leptospire to mouse fibroblasts (L929) and its enhancement by specific antibody. *J Med Microbiol.* 1984.18 (1): 73-85.
- Virkola R, Lahteenmaki K, Eberhard T, Kuusela P, van Alphen L, Ullberg M e Korhonen TK. Interaction of *Haemophilus influenzae* with the mammalian extracellular matrix. *J Infect Dis.* 1996.173 (5): 1137-1147.
- Wang B, Sullivan J, Sullivan GW e Mandell GL. Interaction of leptospire with human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun.* 1984.44 (2): 459-464.
- Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS e Ulevitch RJ. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol.* 2001.2 (4): 346-352.
- WHO WHO (2003). Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. Geneva, Switzerland.

- Xolalpa W, Vallecillo AJ, Lara M, Mendoza-Hernandez G, Comini M, Spallek R, Singh M e Espitia C. Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics*. 2007.7 (18): 3332-3341.
- Yan W, Faisal SM, McDonough SP, Chang CF, Pan MJ, Akey B e Chang YF. Identification and characterization of OmpA-like proteins as novel vaccine candidates for *Leptospirosis*. *Vaccine*. 2010.28 (11): 2277-2283.
- Yan Y, Chen Y, Liou W, Ding J, Chen J, Zhang J, Zhang A, Zhou W, Gao Z, Ye X e Xiao Y. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to *leptospira*. *J Chin Med Assoc*. 2003.66 (4): 224-230.
- Yavlovich A, Higazi AA e Rottem S. Plasminogen binding and activation by *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immun*. 2001.69 (4): 1977-1982.
- Young KC, Shi GY, Wu DH, Chang LC, Chang BI, Ou CP e Wu HL. Plasminogen activation by streptokinase via a unique mechanism. *J Biol Chem*. 1998.273 (5): 3110-3116.
- Yu CS, Lin CJ e Hwang JK. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci*. 2004.13 (5): 1402-1406.
- Zhang L, Zhang C, Ojcius DM, Sun D, Zhao J, Lin X, Li L, Li L e Yan J. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. *Mol Microbiol*. 2012.83 (5): 1006-1023.
- Zipfel PF, Wurzner R e Skerka C. Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Mol Immunol*. 2007.44 (16): 3850-3857.
- Zucker S, Lysik RM, Gurfinkel M, Zarrabi MH, Stetler-Stevenson W, Liotta LA, Birkedal-Hansen H e Mann W. Immunoassay of type IV collagenase/gelatinase (MMP-2) in human plasma. *J Immunol Methods*. 1992.148 (1-2): 189-198.