



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Amanda Silva Hecktheuer

**Análise proteômica de *L. interrogans* sv. Copenhageni str. 10A em resposta a
disponibilidade de zinco**

Florianópolis
2022

Amanda Silva Hecktheuer

**Análise proteômica de *L. interrogans* sv. Copenhageni str. 10A em resposta a
disponibilidade de zinco**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em
Biotecnologia e Biociências.
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ruiz Mazon

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Hecktheuer, Amanda

Análise proteômica de *L. interrogans* sv. Copenhageni str. 10A em resposta a disponibilidade de zinco / Amanda Hecktheuer ; orientador, Ricardo Ruiz Mazzon, 2022.
108 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Homeostase de metais. 3. Microbiologia. 4. Doenças negligenciadas. 5. Fisiologia bacteriana. I. Ruiz Mazzon, Ricardo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Amanda Silva Hecktheuer

**Análise proteômica de *L. interrogans* sv. Copenhageni str. 10A em resposta a
disponibilidade de zinco**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Ricardo Ruiz Mazzon
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Glauber Wagner
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Frederico Schmitt Kremer
Universidade Federal de Pelotas

Certificamos que esta é a versão **original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Ricardo Ruiz Mazzon
Orientador

Florianópolis, 2022.

Às mulheres inspiradoras que se dedicam diariamente para realizar pesquisas de excelência, independentemente dos desafios.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço aos meus pais, Rodolpho e Zeni, por todo o amor e apoio incondicional. Minha maior meta é ser motivo de orgulho e conseguir retribuir o investimento que vocês depositam em mim. Aos demais familiares, em especial aos meus irmãos, pela cumplicidade e carinho de sempre. Obrigada por terem me feito mais forte em todos esses anos.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Ricardo Ruiz Mazzon por ter me concedido a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e por acreditar na minha capacidade de realizar este trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos e pelo exemplo de competência e profissionalismo. Pela admirável capacidade de agir como orientador e amigo, simultaneamente, agradeço. Não posso deixar de agradecer a Prof^ª. Dr. Fabienne Antunes pelo apoio e disponibilidade nos momentos que precisei, pelo cuidado com cada membro do grupo. És uma fonte de inspiração e força como mulher cientista.

Gostaria de agradecer ao Laboratório de Genética Molecular Bacteriana, por terem me acolhido tão bem, por serem pessoas e profissionais exemplares. Obrigada por tornarem as dificuldades da vida acadêmica mais leve. Sempre levarei vocês comigo. Em especial, eu gostaria de agradecer aos colegas, Bruno, Maria, Sayonara, Andie, Magali, Marcel e Jardel, por acompanharem mais de perto essa trajetória.

Sou sortuda em ser rodeada de pessoas excepcionais que contribuíram para me tornar a profissional que sou hoje. Devo agradecer também aos colegas de pós-graduação por compartilhar de conversas técnicas, científicas e da vida. Agradeço com carinho à Joana, Isabela, Natana, Ruth, Juliano, Eduarda, Diego, Vitória e Felipe. Dos melhores momentos que vivi nesse mestrado, compartilhei com vocês. Não poderia deixar de agradecer a Ana Cláudia, por ser fundamental nesses anos, por torcer por mim e pela amizade sincera.

Agradeço aos professores do MIP/CCB/UFSC, principalmente ao Prof. Dr. Daniel Mansur e ao Prof. Dr. André Báfica por ceder acesso a equipamentos e reagentes. Aos amigos do Laboratório de Imunobiologia/UFSC por todo auxílio e aprendizado. Aos técnicos do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), pelo suporte diário. Ao Laboratório de Protozoologia/UFSC, por disponibilizarem de sua estrutura para a realização dos experimentos.

A Prof^ª. Dr. Angela Barbosa e sua equipe técnica pela colaboração e parceria ao disponibilizar a estrutura e equipamentos necessários para as análises de curva de viabilidade. Ao B.Sc. Vilmar Benetti Filho pelo auxílio e colaboração.

Por fim, à Universidade Federal de Santa Catarina e ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, pela oportunidade de ensino público de qualidade e produção científica de alto nível. Às agências financiadoras CAPES E CNPq pelo suporte financeiro e técnico para o êxito de meu trabalho. Ao investimento na ciência nacional!

Aos demais que passaram por minha vida, que contribuíram e acrescentaram no fechamento deste ciclo,

Muito obrigada!

“Só quando nosso cérebro inteligente e nosso coração humano trabalham juntos é
que nós podemos atingir todo o nosso potencial”

(GOODALL, Jane)

RESUMO

Leptospiras são bactérias Gram-negativas móveis dotadas de estratégias para invasão e disseminação eficientes no hospedeiro. Sendo classificada como o agente etiológico da leptospirose, uma doença infecciosa emergente com complicações humana e veterinária. Esta doença é transmitida ao homem através da urina de animais infectados, principalmente roedores, ou com ambiente contaminado pela urina destes animais. Mesmo sendo considerada a maior zoonose em termos de morbidade e mortalidade, a leptospirose ainda é uma doença negligenciada. A relação patógeno-hospedeiro dessa zoonose está sendo progressivamente descrita. Sabe-se que o hospedeiro emprega uma série de estratégias para privar o patógeno de metais essenciais, como o zinco, ou também conter as infecções bacterianas aumentando o nível de metais. Esse processo é denominado imunidade nutricional. O zinco é considerado um dos nutrientes metálicos fundamentais na modulação das interações patógeno-hospedeiro, sendo um componente estrutural, catalítico e regulatório de diversas biomoléculas. Sendo assim, descrever o processo no qual as leptospiras controlam a disponibilidade intracelular do cofator metálico zinco é essencial para compreender os mecanismos realizados por essa bactéria para sobreviver tanto a privação de zinco quanto a toxicidade. Nesse trabalho, investigamos o perfil proteômico de *Leptospira interrogans* sv. Copenhageni str. 10A cultivada em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris contendo o quelante de zinco TPA ou $ZnCl_2$. As concentrações de metal e quelante foram pré-determinadas por uma curva de viabilidade por microscopia de campo escuro fazendo uso de uma câmara de contagem Petroff-Hausser realizada com diferentes concentrações das moléculas. Um total de 2161 proteínas foram identificadas no proteoma celular de *L. interrogans*. Após a triagem de proteínas identificadas em todas as réplicas biológicas, analisamos 513 proteínas, onde exclusivamente 195 proteínas foram reprimidas por zinco e 318 induzidas. Além disso, 163 pertencentes exclusivas da condição limitada de zinco e 141 proteínas únicas de zinco. As proteínas identificadas como diferencialmente expressas entre as condições experimentais (razão de abundância entre TPA/ZINCO $\leq 1,5$ e $\geq 0,75$) foram catalogadas conforme clusters de grupos ortólogos (COGs), sendo eles: (i) funções metabólicas 37,8% das proteínas identificadas; (ii) armazenamento e processamento de informações 21,08%; (iii) processos celulares e sinalização 28,04%; e (iv) mal caracterizados 10,65%. Todos os processos analisados apresentam proteínas reprimidas e induzidas por zinco, mostrando como o proteoma de *L. interrogans* é dinâmico e reforça o papel essencial do zinco em diversas vias e processos celulares. Nossos dados revelaram uma dinâmica no proteoma da bactéria, impactando em diversos processos celulares. A grande maioria das proteínas expressas diferencialmente entre as condições estão envolvidas com funções metabólicas. Dentre elas, o metabolismo de compostos de 1 carbono, a via de biossíntese do folato e a biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos. Além disso, processos importantes para a interação leptospira/hospedeiro como motilidade e quimiotaxia se apresentam induzidos pelas alterações da disponibilidade de zinco. Proteínas estocadoras de zinco (ribossomais), chaperonas moleculares e proteínas pertencentes a sistemas do tipo ABC foram induzidas por zinco em *L. interrogans*. Este trabalho identificou várias proteínas classificadas como hipotéticas no proteoma da bactéria. A sua maioria, não apresenta similaridade com proteínas já descritas, reforçando a importância de maiores estudos para a compreensão de seu papel na tolerância ao zinco. Estudos envolvendo a homeostase do zinco em *L. interrogans* são necessários para interpretar como as leptospiras sentem e respondem aos diversos microambientes. Além disso, tais fatores impulsionam a necessidade de definir mecanismos de virulência, estratégias de adaptação ambiental e descobrir novas opções terapêuticas.

Palavras-chave: Espiroquetas. Imunidade nutricional. Homeostase de zinco. Proteômica.

ABSTRACT

Leptospire are motile Gram-negative bacteria with strategies for efficient invasion and dissemination in the host. They are classified as the etiological agent of Leptospirosis, an emerging infectious disease with human and veterinary complications. This disease is transmitted to humans through the urine of infected animals, mainly rodents, or through environments contaminated by the urine of these animals. Even though it is considered the major zoonosis in terms of morbidity and mortality, leptospirosis is still an extremely neglected disease. The pathogen-host relationship of this zoonosis is being progressively described. It is known that the host employs a number of strategies to deprive the pathogen of essential metals, such as zinc, as well as containing bacterial infections by increasing the level of metals. This process is called nutritional immunity. Zinc is considered one of the key metal nutrients in modulating pathogen-host interactions, being a structural, catalytic, and regulatory component of several biomolecules. Therefore, describing the process by which leptospire controls the intracellular availability of the metal cofactor zinc is essential to understanding the mechanisms by which these bacteria survive both zinc deprivation and toxicity. In this work, we investigated the proteomic profile of *Leptospira interrogans* sv. Copenhageni str. 10A grown in Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris medium containing the zinc chelator TPA or ZnCl₂. The metal and chelator concentrations were predetermined by a viability curve with dark-field microscopy using a Petroff-Hausser counting chamber performed with different concentrations of the molecules. A total of 2161 proteins were identified in the cellular proteome of *L. interrogans*. After the screening of identified proteins in all biological replicates, we analyzed 513 proteins, where exclusively 195 proteins were repressed by zinc and 318 induced. In addition, 163 were exclusive to the zinc-limited condition and 141 proteins were unique to zinc. The proteins identified as being differentially expressed between the experimental conditions (abundance ratio between TPA/ZINC $\leq 1,5$ e $\geq 0,75$) were cataloged according to clusters of orthologous groups (COGs), these being: (i) metabolic functions 37.8% of the identified proteins; (ii) information storage and processing 21.08%; (iii) cellular processes and signaling 28.04%; and (iv) poorly characterized 10.65%. All the processes analyzed presented both repressed and zinc-induced proteins, showing how dynamic the proteome of *L. interrogans* is and also reinforcing the essential role of zinc in various cellular pathways and processes. Our data revealed a dynamic in the bacterial proteome, impacting several cellular processes. Most of the differentially expressed proteins between conditions are involved in metabolic functions. These include the metabolism of 1-carbon compounds, the folate biosynthesis pathway, and the biosynthesis of amino acids and nucleotides. Furthermore, important processes for leptospira/host interaction such as motility and chemotaxis are induced by changes in zinc availability. Zinc storage (ribosomal) proteins, molecular chaperones, and proteins belonging to ABC Transporter Systems were induced by zinc in *L. interrogans*. This work identified several proteins classified as hypothetical in the bacterial proteome. Most of them are not similar to previously described proteins, reinforcing the importance of further studies to understand their role in zinc tolerance. Studies involving zinc homeostasis in *L. interrogans* are necessary to interpret how leptospire sense and respond to various microenvironments. Furthermore, such factors drive the need to define virulence mechanisms, environmental adaptation strategies, and discover new therapeutic options.

Keywords: Spirochetes. Nutritional immunity. Zinc homeostasis. Proteomics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxo metodológico básico utilizado para a realização do presente trabalho com enfoque na análise do proteoma de *L. interrogans* sob condições de meio limitado e repleto de zinco.....33
- Figura 2.** Sobrevivência relativa de *L. interrogans* sv. Copenhageni str. 10A em diferentes regimes de disponibilidade de zinco.....38
- Figura 3.** Perfil do proteoma celular de *L. interrogans* cultivada em meio limitado e rico em zinco. Diagrama de Venn representando proteínas totais presentes em todas as replicatas.....40
- Figura 4.** Diagrama de Venn referente as proteínas identificadas e quantificadas.....41
- Figura 5.** Distribuição das proteínas diferencialmente expressas de acordo com a categorização do COG. No Eixo Y temos o número de proteínas e no eixo X as categorias COG. As barras se referem ao número de proteínas com níveis aumentados (indicados como positivos no eixo Y em azul) ou níveis diminuídos (indicados como negativos no eixo Y em vermelho) a partir da comparação entre as condições de cultivo TPA/zinco.....62
- Figura 6.** Distribuição das proteínas diferencialmente expressas de acordo com a categorização do COG. No Eixo Y temos o número de proteínas e no eixo X as categorias COG. As barras se referem ao número de proteínas, indicados como exclusivo de zinco no eixo Y em azul e indicados como exclusivo de TPA no eixo Y em vermelho.....63
- Figura 7.** Distribuição das subcategorias de COG utilizadas no trabalho. As barras presentes no eixo X representam o valor total de proteínas identificadas nas condições experimentais: Induzidas por zinco e reprimidas por zinco. No eixo Y temos a abundância relativa de subcategorias de COG em porcentagem.....64
- Figura 8.** Distribuição das subcategorias de COG utilizadas no trabalho. As barras presentes no eixo X representam o valor total de proteínas identificadas nas condições experimentais: Exclusivas em zinco e exclusivas em TPA. No eixo Y temos a abundância relativa de subcategorias de COG em porcentagem.....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas diferencialmente expressas entre carência e abundância de zinco (TPA/ZnCl ₂).....	43
Tabela 2 – Proteínas expressas exclusivamente na presença de zinco.....	50
Tabela 3 – Proteínas expressas exclusivamente na carência de zinco.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Alfa
β	Beta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AltPRs	Proteínas ribossomais alternativas independentes de zinco
ATP	Adenosina trifosfato
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
$\beta\beta$ - OMP	<i>Beta barrel outer membrane protein</i> (Proteína Barril-Beta de membrana externa)
cDNA	DNA complementar
COGs	<i>Cluster of Orthologous Groups of proteins</i> (Cluster de Grupos Ortólogos de proteínas)
Ct	<i>Cycle threshold</i> (Limiar do ciclo)
c-di-GMP	Diguanilato cíclico
DO	Densidade óptica
DALY	<i>Disability-Adjusted Life Year</i> (Ano de vida ajustado por incapacidade)
DEPC	Dimetil pirocarbonato
DGC	Diguanilato ciclase
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Dithiothreitol
EDDS	S,S-ethylenediaminedissuccinic acid
EMJH	Meio Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris
FD	<i>Fold change</i> (mudança de dobra)
Fur	<i>Ferric uptake regulator</i> (Regulador de captação de ferro)
GCYH-I	GTP Ciclohidrolase I
GeMBac	Laboratório de Genética molecular bacteriana
H	Hora(s)

HSP	<i>Heat shock protein</i> (Proteínas de choque térmico)
LC/MS	Cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas
LIC	<i>Leptospira interrogans</i> sorovar <i>Copenhageni</i>
Lig	Leptospiral Immunoglobulin-like
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MAT	<i>Microscopic Agglutination Test</i> (Teste de Aglutinação Microscópica)
min	Minuto(s)
mM	Milimolar
mL	Mililitro
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i> (tipificação de sequências de vários loci)
ms	Milissegundo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)
nm	Nanômetro
OADC	Oleic Acid Albumin Dextrose Complex
OMP	<i>Outer membrane protein</i> (Proteína de membrana externa)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	<i>Open reading frames</i> (fases de leitura aberta)
pb	Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)
PBS	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeira da Polimerase)
PDE	Fosfodiesterase
PRs	Proteínas ribossomais
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (reação quantitativa em cadeia da polimerase)
qRT-PCR	<i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i> (reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa)
rpm	Rotações por minuto
TPA	Tris(2-pyridylmethyl)amine
TBDR	<i>TonB-Dependent Receptors</i> (Proteínas receptoras dependentes de TonB)
THF	Tetrahidrofolato
TPEN	(N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine)

UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
Zn ²⁺	Íons de zinco
ZnCl ₂	Cloreto de zinco
Zur	<i>Zinc uptake regulator</i> (Regulador de captação de zinco)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Leptospira	15
1.2	Leptospirose.....	17
1.3	Diagnóstico, tratamento e prevenção da Leptospirose	19
1.4	Ciclo de vida e interação patógeno-hospedeiro	20
1.5	Fatores de virulência em Leptospiras	21
1.5.1	Ligação de leptospira a componentes plasmáticos	22
1.5.2	Componentes do sistema complemento	22
1.5.3	Motilidade.....	23
1.5.4	Aquisição de Íons	23
1.6	Imunidade Nutricional	24
1.7	zinco.....	25
1.8	Mecanismo de homeostase de zinco	25
1.8.1	Sistemas de aquisição	26
1.8.2	Sistemas de efluxo	28
1.9	Fator de transcrição Zur e a resposta a zinco.....	28
1.10	Zur e a Biotecnologia.....	30
2	HIPÓTESE.....	32
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo Geral	32
3.2	Objetivos Específicos	32
4	METODOLOGIA.....	33
4.1	Cepas e condições de cultivo	34
4.2	Curva de viabilidade	34
4.3	Preparação das amostras para análise proteômica	35
4.4	Extração proteica e quantificação	35

4.5	Espectrometria de massas <i>in tandem</i>	35
4.6	Análise por espectrometria de massas <i>in tandem</i>	36
4.7	Análise de Clusters de grupos ortólogos (COG)	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Curva de viabilidade	38
5.2	Espectrometria de massa.....	39
5.3	Análise de categorias funcionais	61
5.3.1	Metabolismo	66
5.3.2	Armazenamento e processamento de informações	69
5.3.3	Processos celulares e sinalização	71
5.3.4	Mal caracterizadas	77
6	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	Error! Bookmark not defined.
7	ANEXO A: Material suplementar – Banco DBBM	998

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEPTOSPIRA

As leptospiras são espiroquetas de estrutura fina e helicoidal, com cerca de 0,1 μ m de diâmetro e comprimento variável de 6-20 μ m (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2009). Pertencentes ao filo *Spirochaetes*, ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae* e gênero *Leptospira*, o qual anteriormente era dividido em 35 espécies (patogênicas, intermediárias e saprófitas). Além disso, relata-se a existência de pelo menos 300 sorovares de leptospiras patogênicas quando classificadas sorologicamente conforme sua antigenicidade, definida pela composição química do lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa (THIBEAUX et al., 2018). Atualmente, um novo estudo baseado em genômica comparativa, relata que o gênero *Leptospira* contém 64 espécies divididas em dois clados e 4 subclados denominados P1 (patogênicas), P2 (intermediárias) e S1 e S2 (saprófitas) (VINCENT et al., 2019). Dessa forma, essas espiroquetas são classificadas em dois grandes clados, o primeiro abrangendo as leptospiras patogênicas e intermediárias, descritas por ter potencial para causar doença em animais e humanos, e o segundo representado pelas saprófitas (de vida livre) não causando a doença.

O genoma das leptospiras é distribuído em dois cromossomos circulares (CI e CII). O comprimento cumulativo dos cromossomos varia entre 3,9 a 4,6 Mb, sendo o cromossomo circular maior (CI) com cerca de 4,3 Mb e o CII variando entre 278 e 350 kb, ambos contendo genes essenciais à sobrevivência do patógeno. Esta variação de comprimento vem se demonstrado diferente do tradicionalmente apresentado por outras espiroquetas, (1.138.006 pb para *T. pallidum* e 1.519.857 pb para *B. burgdorferi*, incluindo plasmídeos) (“The spirochetes: molecular and cellular biology.”) o que evidencia que esta variabilidade confere às leptospiras a competência em se adaptar a uma extensa variedade de hospedeiros e ambientes (PICARDEAU et al. 2008). Além disso, o genoma da espécie saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc, cepa Patoc I, se difere pela presença de um terceiro cromossomo com apenas 74kb, nominado de p74 (PICARDEAU et al., 2008). O genoma de *L. interrogans* é caracterizado por um conteúdo GC de 35-42%, possuindo aproximadamente 3.4000 genes codificadores previstos, dentre eles 656 são descritos como patógeno-específicos e não estão presentes na cepa saprófita *L. biflexa*. Entretanto, uma grande barreira a ser superada é o fato de a maioria destes genes (59%) apresentarem suas funções desconhecidas (REN et al., 2003). Sugerindo assim, a

presença de fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade exclusivos de *Leptospira* spp. ainda não elucidados (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2009).

As leptospiros possuem uma estrutura de dupla membrana similar a bactérias Gram-negativas, na qual a membrana citoplasmática está estreitamente associada à parede celular de peptidoglicano, similar a bactérias gram-positivas. Entre a membrana externa e a membrana interna consta um espaço periplasmático em que se localiza dois flagelos denominados endoflagelo ou filamento axial (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004). A membrana externa apresenta lipopolissacarídeos (LPS) associadas, que se difere das demais bactérias gram-negativas pelo sua menor atividade endotoxigênica, além de uma estrutura incomum do Lipídeo A, que está intimamente relacionado com a afinidade ao receptor do tipo Toll-like 2 (TLR2) e a variabilidade de sorovares (QUE-GEWIRTH et al., 2004). O LPS é descrito como um dos principais antígenos de membrana em leptospiros, uma vez que a imunidade descrita contra as leptospiros é predominantemente de natureza humoral e direcionada ao LPS, sendo a proteção após infecção efetiva apenas contra o mesmo sorovar ou similares e por tempo bastante limitado (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2009)

Além do LPS, o folheto externo da membrana externa é composto por diversas proteínas transmembranas e lipoproteínas expostas na superfície que desempenham funções estruturais e funcionais. Em razão da localização externa a membrana, numerosas proteínas apresentam a capacidade de interagir moléculas do hospedeiro auxiliando assim nas etapas de invasão e evasão do sistema imune do hospedeiro sendo já demonstrado por numerosos pesquisadores que as proteínas de membrana são cruciais para o início do processo de adesão às células hospedeiras (ATZINGEN et al., 2008; BARBOSA et al., 2006, 2010; DAROZ et al., 2021). Além disso, as proteínas integrais de membrana externa são consideradas potenciais antígenos para vacinas e testes diagnóstico como exemplos as proteínas LipL32 e Lig A/B.

Dentre as proteínas de membrana externas (OMP) a proteína LipL32, também conhecida por *hemolysis-associated protein 1* (Hap1) é uma lipoproteína de membrana externa com 32 kDA que possui 272 aminoácidos com 19 resíduos de lipidação na sequência sinal, sendo a proteína mais expressa durante a infecção de mamíferos e presente em maior quantidade na membrana do patógeno (HAAKE et al., 2000). Caracterizada por ser altamente conservada nos sorovares patogênicos das espécies de *Leptospira*, o que sugere um papel importante durante a infecção (MURRAY, 2013). O antígeno já mostrou proteção parcial quando administrada com a subunidade β da enterotoxina termolábil de *E. coli* (GRASSMANN et al., 2012) e também quando vetorizada por Bacilo Calmette–Guérin recombinante (rBCG)

(SEIXAS et al., 2007). Apesar de ser uma proteína de grande abundância e presente exclusivamente nas cepas patogênicas do gênero, o papel da LipL32 continua incompreendido (MURRAY, 2013). Quando avaliada a virulência em modelos animais de cepa mutante por transposição para *lipL32*, nenhuma atenuação foi constatada além de a interação com moléculas do hospedeiro *in vitro* ocorrer da mesma maneira (MURRAY et al., 2009).

Outras proteínas extensivamente estudadas são as proteínas Lig, *leptospira immunoglobulin-like proteins*. As ligas são caracterizadas por apresentarem *domínios Bacterial immunoglobulin-like* (domínio Big_2 PF02368) repetidos em sequência e uma alta massa molecular. Revisado recentemente por Haake e Matsunaga, 2021, as proteínas LigA, LigB e LigC desempenham papéis fundamentais nos mecanismos de patogênese das leptospiroses como por exemplo: apresentam a capacidade de se aderir a uma gama de ligantes do hospedeiro, potente imunógenos, fortes antígenos imunoprotetores em modelos animais contra a doença e sorodiológicos (HAAKE; MATSUNAGA, 2021).

Ultimamente, Fernandes e colaboradores (2021) obtiveram pela técnica de interferência CRISPR (CRISPRi) cepas silenciadas para LipL32 e duplo LigA/LigB (LigAB) em *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. O trabalho avaliou o impacto da ausência das proteínas a nível proteômico e também sua virulência em modelo animal para leptospirose. Resultados obtidos relatam que os hamsters quando infectados com a cepa LigAB manifestaram a doença na forma crônicas assintomáticas, representando a redução da virulência quando comparado aos controles. Por outro lado, os animais desafiados com o mutante LipL32 apresentaram sintomatologia grave em um prazo menor do que o aparecimento dos mesmos sintomas nos membros do grupo controle. O mutante LipL32 apresentou 243 proteínas expressas diferencialmente, sendo reguladas positivamente diversas proteínas de membrana externa como: LigB, LipL31, LipL45 e LipL41. Os autores concluem que o aumento dos níveis dessas proteínas pode estar envolvido com a necessidade da bactéria em manter a integridade da membrana causada pela ausência da proteína LipL32 resultando no aumento significativo na virulência. Para o mutante LigAB, 46 proteínas foram expressas de forma diferencial (FERNANDES et al., 2022).

1.2 LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma doença de importância global e conjuntamente um problema de saúde pública estimado 1,03 milhões de casos de leptospirose com 58.900 mortes registrados

anualmente, tornando-a a maior zoonose em termos de mortalidade e morbidade (COSTA et al., 2015). Além disso, é responsável por aproximadamente 2,9 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALY), uma medida baseada no tempo que combina anos de vida perdidos devido à mortalidade prematura (YLLs) e anos de vida perdidos devido ao tempo vivido em estados com menos de saúde plena ou anos de vida saudável perdidos por incapacidade (YLDs). Um DALY representa a perda do equivalente a um ano de saúde plena. (TORGERSON et al., 2015). Além disso, esta zoonose é considerada emergente visto que a incidência está aumentando tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (SHIVAKUMAR et al., 2008). Pressupõe-se que a estimativa seja ainda maior, uma vez que esta zoonose é comumente confundida com febres hemorrágicas, devido à sua sintomatologia (MCBRIDE et al., 2005).

Diferentes espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* são causadoras da leptospirose, uma doença febril aguda que ocorre tanto em humanos como em animais sendo descrita em áreas rurais e urbanas. O ser humano é considerado um hospedeiro acidental e sua infecção é decorrente da exposição direta à urina de animais infectados, ou indireta pelo contato com água, solo ou alimentos contaminados (ADLER, 2015). A leptospirose é raramente transmitida de humanos para humanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003)

A *Leptospira* entra na circulação através de feridas na pele ou membranas mucosas e rapidamente estabelece uma infecção sistêmica e comumente pode ser encontrada intracelularmente, sugerindo que esta use as células hospedeiras como um mecanismo de transporte rápido e de evasão ao sistema imune do organismo infectado (BAROCCHI et al., 2002; THOMAS; HIGBIE, 1990). As manifestações clínicas da leptospirose em humanos variam. A doença pode se manifestar desde uma infecção subclínica, até uma grave infecção como a Síndrome de Weil, forma clássica grave da doença. Os sintomas da doença são inespecíficos e altamente confundidos como pertencentes a arboviroses, sendo eles: Febre, calafrios, tosse, dor de cabeça, e sintomas gastrointestinais. Os pacientes também podem desenvolver a síndrome da hemorragia pulmonar grave (SPHS) com manifestações como dispneia, crepitações e hemoptise maciça. As taxas de mortalidade associadas à LPHS são >50% e letalidade >70% (CRODA et al., 2010; GOUVEIA et al., 2008). Ambas as síndromes são caracterizadas por complicações sistêmicas, incluindo icterícia, meningite, hemorragia pulmonar, disfunção hepática e renal e colapso cardiovascular. Na veterinária, a leptospirose é considerada uma das principais doenças infecciosas, responsável por grandes perdas econômicas (ELLIS, 2014; HAAKE; LEVETT, 2015).

1.3 DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA LEPTOSPIROSE

O diagnóstico da Leptospirose pode ser realizado em diferentes abordagens laboratoriais (métodos imunológicos, moleculares e imunocromatográficos) com base na detecção direta ou indireta do agente etiológico, antígenos proteicos ou material genético. A Organização Mundial da Saúde denomina como padrão ouro para detecção o teste de Microaglutinação (MAT) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). Porém, devido à baixa sensibilidade nos primeiros sintomas, subjetividade na interpretação dos resultados e a necessidade de um painel de cepas vivas torna-se evidente a necessidade no desenvolvimento de tecnologias acessíveis e eficazes para detecção e diagnóstico precoce (ADESIYUN et al., 2011; MCBRIDE et al., 2005).

O tratamento de leptospirose depende grandemente dos sintomas apresentados, entretanto, frequentemente o uso de Doxiciclina tem sido relatado como eficiente para a redução da severidade e duração da doença (MCCLAIN et al., 1984). A Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003) recomenda o começo do uso de antibióticos de preferência antes do quinto dia após o início da doença, visto que os benefícios são controversos após esse prazo, ou melhor, no primeiro momento em que houver a suspeita do diagnóstico para leptospirose. Reforçando que não é recomendado que os médicos esperem pelos resultados dos diagnósticos laboratoriais para dar início a antibioticoterapia, devido ao fato dos testes sorológicos apresentarem baixa sensibilidade (podendo não apresentarem resultados positivos em até uma semana após o início da doença) e o isolamento por culturas ser lento e fastidioso (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

As medidas para o controle dessa zoonose se limitam em melhorias nas habitações humanas e no saneamento básico, além do combate a roedores (reservatórios da doença), visto que esses animais tem seus túbulos renais colonizados pelas leptospirosas, sem manifestar a doença (HAAKE; LEVETT, 2015). Em consideração a complexidade de implementação e eficácia dessas medidas, atualmente não é descrito um método de controle universal aplicável a todos os contextos. Dessa forma, a vacinação é a medida profilática mais promissora para vigilância da leptospirose, porém, até o momento nenhuma formulação vacinal foi capaz de apresentar uma imunidade protetora, esterilizante e duradoura contra todos os sorovares (DELLAGOSTIN et al., 2011).

Atualmente, a vacina disponível comercialmente é constituída de células inativadas por calor ou formaldeído (bacterinas), sendo amplamente legalizada para uso veterinário e estritamente disponível para uso humano (disponível em países como China, Cuba, França e Japão) (DELLAGOSTIN et al., 2011). A resposta imune gerada por esta formulação é predominantemente direcionada ao LPS, que por ser um antígeno timo independente, estimula diretamente os plasmócitos a produzir anticorpos, sem a necessidade de uma célula T auxiliar. Dessa forma além de gerar um resposta sorovar-dependente e necessário reforços anuais para manutenção da imunidade (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2009).

1.4 CICLO DE VIDA E INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO

A leptospirose humana apresenta uma distribuição geográfica global extremamente ampla, sendo que a América Latina, o sudeste asiático e a Oceania são os locais de maior prevalência endêmica. Nestes locais, normalmente os surtos estão associados a tempestades e inundações que ressuspendem a *Leptospira* do solo nos corpos d'água (VICTORIANO et al., 2009). Durante a exposição indireta, a *Leptospira* deve superar o desafio de penetrar no hospedeiro brevemente após ser excretada no meio ambiente ou sobreviver na água por um período considerável para causar doenças por contaminação da água. Dados sugerem que leptospirosas patogênicas podem sobreviver na água por longos períodos, porém não se multiplicam (BIERQUE et al., 2020).

Há relatos, como acontece no Brasil, de mudanças epidemiológicas da leptospirose que passou de eventos esporádicos em ambientes rurais para eventos de suma importância no cotidiano das grandes cidades (KO et al., 1999). O Brasil é o país da América do Sul com o maior número de casos de leptospirose reportados entre 2007 e 2014 (Veja healthmap.org para novos surtos de Leptospirose).

Muitos sorovares de *L. interrogans* estão adaptados a reservatórios mamíferos específicos, sendo armazenados nos túbulos renais e eliminados na urina, todavia, podem sobreviver por algumas semanas no ambiente quando eliminados juntamente com a urina até a infecção de um novo hospedeiro. A transmissão da doença necessita de uma circulação enzoótica contínua, sendo alguns sorotipos preferencialmente encontrados em ratos e outros em camundongos, como acontece com os grupos *Icterohaemorrhagiae* e *Ballum* (BHARTI et al., 2003; NASCIMENTO, 2004; THIERMANN, 1981).

A relação patógeno-hospedeiro dessa zoonose está sendo gradativamente elucidada. Sabe-se que após a entrada no hospedeiro, as leptospirosas saprófitas são rapidamente eliminadas,

ao contrário das cepas patogênicas que são munidas com estratégias para modular o microambiente visando superar as barreiras imunológicas do hospedeiro. Logo após, ao chegar na corrente sanguínea, as leptospiros devem escapar do efeito bactericida do sistema complemento, podendo assim se multiplicar e colonizar órgãos imunoprivilegiados (EVANGELISTA; JENIFER, 2010). Normalmente, após o processo infeccioso, uma resposta imune efetiva contra o patógeno é desenvolvida em uma ou duas semanas. A infecção apresenta um período de incubação que pode atingir até duas semanas sem manifestação sintomática, sendo após este período o início dos sintomas clássicos como a febre (MCBRIDE et al., 2005).

Dessa forma, dois fatores são importantes, a aptidão da bactéria em evadir os mecanismos de defesa, tais como sistema complemento e sistema fagocítico e capacidade de adesão das leptospiros patogênicas a células e a proteínas da matriz extracelular (FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2011). As cepas patogênicas desenvolveram estratégias para escapar do ataque do sistema complemento, secretando proteínas com afinidade a componentes do hospedeiro, produzindo proteases que já foram analisadas como presentes no sobrenadante de cultura de linhagens patogênicas como capazes de degradar diversas moléculas do hospedeiro (FRAGA; ISAAC; BARBOSA, 2016).

1.5 FATORES DE VIRULÊNCIA EM LEPTOSPIRAS

As leptospiros não possuem fatores de virulência clássicos como visto em outros patógenos, como sistemas de secreção do tipo III, tipo IV e tipo VI (NASCIMENTO, A; et al. 2004). Entretanto, as dificuldades de cultivo e manipulação genética de *Leptospira* sp. contribuem muito para a baixa compreensão dos mecanismos de patogênese desta bactéria. A partir da obtenção de uma ampla biblioteca de mutantes foi possível obter avanços na caracterização de possíveis fatores de virulência em leptospiros (BOURHY, 2005; CRODA et al., 2008). Porém, a existência de uma compensação funcional de proteínas leptospirais silenciadas, e dificuldade no cultivo e engenharia genética desta bactéria, ainda se apresentam como barreiras.

O mecanismo de virulência e, de maneira geral, o entendimento básico da biologia geral do agente causador da leptospirose também permanece pouco conhecido. Foram descritos em diversos organismos mecanismos regulatórios em resposta a situações específicas, mediados por RNAs não codificantes, fatores de virulência regulados por fatores transcricionais das mais distintas famílias ou ainda mediados por processos de transdução de sinal

(BALASUBRAMANIAN et al., 2013; GREEN; ROLFE; SMITH, 2014; MASSÉ; VANDERPOOL; GOTTESMAN, 2005; TROXELL et al., 2013).

1.5.1 Ligação de leptospira a componentes plasmáticos

Uma das estratégias de invasão mais bem descritas em leptospiros é a capacidade de adesão da bactéria às moléculas receptoras do hospedeiro, como os componentes da matriz extracelular (MEC), glicosaminoglicanos e receptores celulares como laminina e e-caderina, possibilitando assim a invasão e colonização celular no hospedeiro (OLIVEIRA, et al. 2013, DAROZ, et al 2021). Proteínas integrais de membrana como OmpL1, uma adesina de 31 kDa, já demonstrou poder de interação com laminina e fibronectina plasmática, além de ser um receptor de plasminogênio (capaz de gerar plasmina) e ser reconhecida com especificidade por amostras de soro humano convalescente. Confirmando assim que além da OmpL1 ser um estratégico antígeno vacinal pela sua localização externa a membrana, a mesma auxilia na interação da leptospira com o hospedeiro mamífero, colaborando com a disseminação e infecção da bactéria (FERNANDES et al., 2012). Concomitante a esses resultados e melhor revisado por Daroz e colaboradores, diversas proteínas como LigA e LigB, Lsa (23, 36, 37, entre outras), ErpY, e proteínas catalogadas como hipotéticas interagem com diferentes componentes do hospedeiro (DAROZ et al., 2021).

Além disso, a disseminação das leptospiros durante a infecção é facilitada pela diminuição na formação de coágulos, pela secreção de proteases ou por plasmina de superfície adquirida que apresentam a capacidade de degradar componentes da cascata de coagulação. A formação de coágulos de fibrina, também é prejudicada pela interação de proteínas leptospirais com fibrinogênio e trombina, danificando a manutenção da integridade vascular (DAROZ, et al. 2021).

1.5.2 Componentes do sistema complemento

A infecção causada por leptospiros envolve uma complexa relação patógeno/hospedeiro. O hospedeiro desencadeia uma intensa resposta imunológica, enquanto o patógeno faz uso de fatores de virulência para tentar sobreviver, dentre eles, a secreção de termolisinas (pertencentes a classe das Proteases). Atualmente, há poucas referências acerca da regulação gênica de termolisinas em leptospiros.

A secreção de proteases tem sido descrita como uma estratégia eficaz de evasão imunológica para vários microrganismos e como fatores relevantes na patogênese de diversas

doenças causadas por bactérias, como *Bacillus anthracis* e bactérias do gênero *Vibrio* (CHUNG et al., 2006; MIYOSHI, 2013). Dessa forma, é possível prever que essas proteínas podem estar envolvidas nos mecanismos de patogênese e virulência de *Leptospira* spp. Dado que foi relatado que cepas patogênicas secretam proteases capazes de degradar diversas proteínas da cascata do complemento, cooperando para a resistência sérica e evasão do sistema imunológico, favorecendo a invasão (AMAMURA et al., 2017; FRAGA et al., 2014).

Proteases leptospirais expressas por cepas patogênicas são capazes de desativar moléculas imunes efetoras, visto que uma termolisina recombinante demonstrou ser capaz de clivar C3 purificada de soro humano e recombinante (FRAGA et al., 2013). Dessa forma, as termolisinas representam alvos potenciais para o desenvolvimento de novas terapias e abordagens profiláticas nessa zoonose. Evidências demonstram que a proteína LigB inibe vias do complemento se ligando fortemente aos componentes C3b e C4b (CHOY; STEVENSON, 2012).

1.5.3 Motilidade

A motilidade também é descrita como um dos principais fatores relacionados à patogenicidade das leptospiras. As proteínas homologas a flagelina, FlaA (compõe bainha do flagelo) e FlaB (forma o núcleo) constituem os filamentos flagelares de espiroquetas. Estudos comprovam que as subunidades FlaA são essenciais para a motilidade translacional da leptospira, além da sua forma celular e virulência (LAMBERT et al., 2012). Por outro lado, a deleção de FlaB elimina totalmente o filamento (PICARDEAU; BRENOT; SAINT GIRONS, 2001). Além disso, a deleção de componentes específicos do flagelo (FcpA e FcpB) interrompe a forma superenrolada característica dos flagelos de leptospira, reduzindo significativamente características como motilidade e virulência (WUNDER et al., 2016, 2018). Reforçando assim, que a capacidade de natação das leptospiras é proporcionada por uma configuração única de seu flagelo e essencial para motilidade produtiva.

1.5.4 Aquisição de Íons

Para muitos microrganismos a aquisição de íons metálicos no ambiente ou em hospedeiros infectados é essencial. Estes íons participam de inúmeros processos biológicos compondo metaloproteínas e agindo como cofatores de enzimas, sendo crítica ao microrganismo a obtenção e manutenção dos níveis intracelulares dos mesmos em quantidades

adequadas e não tóxicas. Íons como ferro, zinco, manganês e cobre foram descritos como importantes para a virulência de muitas bactérias patogênicas, sendo suas contribuições variáveis mesmo entre espécies proximamente relacionadas. Recentemente, foi descrito que a espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, agente causador da doença de Lyme e organismo pertencente a mesma família das Leptospiras, apresenta patogenicidade dependente de íons manganês e zinco e independente de ferro (NIES, 2003; PORCHERON et al., 2013; POSEY; GHERARDINI, 2000; TROXELL et al., 2013).

1.6 IMUNIDADE NUTRICIONAL

A imunidade nutricional é um sofisticado processo desenvolvido pelo sistema imune do organismo hospedeiro vertebrado o qual ao sequestrar metais circulantes, como ferro e zinco, faça com que ocorra o desfalque da progressão da infecção e da doença por meio da carência desses elementos essenciais para o crescimento dos organismos invasores. Tendo como objetivo literal, cessar a absorção e uso de nutrientes por patógenos, levando-os ao carecimento nutricional. Esse processo é realizado a partir de múltiplos importadores e exportadores de zinco celular (HOOD; SKAAR, 2012). Sabe-se que este mecanismo imunológico acontece dentro de horas após invasão, e em casos como por exemplo quando estimulado com lipopolissacarídeos, ocorre a redução de cerca de 50% do conteúdo de ferro e zinco circulante (GAETKE et al., 1997; KEMNA et al., 2005)

Além disso, os patógenos microbianos necessitam de metais para se multiplicarem e causarem doenças. No entanto, a captação dos metais deve ser realizada com cautela durante a infecção, porque níveis em excesso causam intoxicação. Dessa forma, também é caracterizado como imunidade nutricional o processo de direcionamento excessivo de metais aos patógenos invasores.

Estudos demonstram que diversos patógenos desenvolveram mecanismos sofisticados para superar a escassez de ferro e zinco em resposta a infecção e inflamação. Nas bactérias, na falta de nutrientes metálicos, sistemas de regulação gênica são cruciais para a adaptação desses patógenos as condições da imunidade nutricional, sendo pelo processo expressão de vias para captação, armazenamento e efluxo, e também enzimas alternativas que utilizaram cofator metálico ou não metálico diferente (POSEY; GHERARDINI, 2000). Dessa forma, em bactérias, a carência de metais ativa vias responsáveis pela importação e mobilização de metais, ao passo que a abundância de metais induz o efluxo e o armazenamento. Como exemplo da espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, agente etiológico da doença de lyme, é o único organismo

conhecido por eliminar a necessidade ferro e substituindo-o pelo uso de manganês (POSEY; GHERARDINI, 2000)

1.7 ZINCO

Metais de transição são elementos pertencentes aos grupos 3 a 12 da tabela periódica cujos átomos apresentam a penúltima camada eletrônica interna incompleta. Devido a isso, esses elementos exibem múltiplas valências. A aquisição de íons metálicos é essencial para a sobrevivência no ambiente ou em seu hospedeiro para todos os microrganismos devido a participação dos metais de transição em muitos processos biológicos cruciais e são frequentemente incorporados em metaloproteínas, incluindo metaloenzimas, proteínas de armazenamento e fatores de transcrição (ANDREINI et al., 2008)

O zinco é considerado um dos fundamentais moduladores nas interações patógeno-hospedeiro e se encontra disponível na natureza na forma do cátion divalente Zn^{2+} , sendo o metal de transição mais comum (ANDREINI, et al 2008). A função de micronutriente em bactérias é semelhante a já observada em eucariotos, especialmente em forneçam atividades bioquímicas essenciais e motivos estruturais para diversas proteínas, além de um mediador de sinalização celular. Dados na literatura apresentam que o zinco é um cofator enzimático potente, presente nas principais classes enzimáticas (WAŹŁY; POTOCKI; ROWIŃSKA-ŻYREK, 2016). Em *Escherichia coli* a concentração aparente de zinco é 10^{-4} M (OUTTEN; O'HALLORAN, 2001).

As proteínas de ligação a Zn representam uma grande parcela proteômico total em eucariotos, bactérias e archaea. O proteoma de zinco em eucariotos representa cerca de 9% do proteoma total. Já em procariotos, esse percentual varia de 5% a 6%, revelando, um aumento substancial do número de proteínas de zinco em organismos eucariotos. Em bactérias e archaea, as enzimas constituem cerca de 80% das proteínas com afinidade a zinco, diferente de em eucariotos que esse percentual é menor que 50%. Apesar disso, em eucariotos os fatores de transcrição Zn-dependentes compreendem 44% das proteínas que contam com zinco. Esses dados demonstram que o Zn desempenha um papel extremamente importante na regulação gênica desses organismos (ANDREINI; BERTINI; ROSATO, 2009).

1.8 MECANISMO DE HOMEOSTASE DE ZINCO

Os metais de transição estão envolvidos em diversos processos biológicos necessários para a sobrevivência de todos os organismos vivos. Porém, esses metais não podem ser sintetizados ou degradados, dependendo exclusivamente da modulação do transporte de captação e exclusão para a homeostase. Para garantir a necessidade celular de metal e a adaptação a condições de limitação ou intoxicação de metais, uma complexa rede de sistema metalorreguladores são ativados modulando a expressão gênica de acordo com as condições enfrentadas. Dentre eles, a ativação de vias alternativas independentes do metal em escassez, regulação negativa de enzimas e parálogos de proteínas que utilizam metal como catalizador ou estrutural e aumento de processos metal-dependentes e proteínas estocadoras em abundância de metal entre outros (WALDRON et al., 2009).

A homeostase do Zn em bactérias é alcançada através de mecanismos delicados como tamponamento intracelular de Zn e percepção de Zn intracelular por fatores de transcrição responsivos ao Zn que estão relacionados com a obtenção ou exportação de Zn. Revisado por Bruins e colaboradores, 2000 e Capdevila e colaboradores, 2016, bactérias desenvolveram diversas estratégias para se adaptar aos diferentes níveis de metais tóxicos por meio de uma variedade de sistemas de resistências, como exemplo: i) Exclusão de metal por barreira de permeabilidade, ii) Transporte ativo do metal para o meio extracelular, iii) Sequestro intracelular do metal por ligação a proteínas, iv) Sequestro extracelular, v) Desintoxicação enzimática do metal para uma forma menos tóxica, vii) Redução da sensibilidade ao metal de alvos celulares. Essas alterações nas parede celular, membrana ou envelope de um microrganismo pode ser mediada por genes cromossomais, de elementos transponíveis de DNA e plasmídias (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000; CAPDEVILA; WANG; GIEDROC, 2016).

1.8.1 Sistemas de aquisição

Como estratégia para combater o patógeno, o hospedeiro libera fatores que suprimem a disponibilidade de metais essenciais para a infecção e sobrevivência do invasor. Dentre eles, a proteína S100 calprotectina que é conhecida como fator da imunidade nutricional por possuir atividade antimicrobiana baseada em sua capacidade de quelar Zn^{2+} e Mn^{2+} no local da infecção, inibindo o crescimento de diversos patógenos humanos (ZACKULAR; CHAZIN; SKAAR, 2015).

Visando superar esse desafio, os fatores de transcrições reguladores de detecção de metal (metaloproteínas) se apresentam como sinalizadoras para que os sistemas de aquisição de metais celulares sejam expressos das condições de ausência, bem como, garantir que os

sistemas de efluxo e armazenamento sejam reduzidos nesta condição ou expressos quando apresentando abundância ou excesso do metal.

Em bactérias, a aquisição de metais é realizada pela ativação da expressão de um conjunto de genes específicos, em sua maioria em regulons, caracteristicamente regulados por uma metaloproteína. As proteínas metalorreguladoras são proteínas multiméricas de ligação ao DNA que sofrem uma transição alostérica quando se ligam a metais. O zinco por sua vez, metal amplamente utilizado na coordenação estrutural de enzimas e proteínas, é ainda mais escasso na maioria dos ambientes e a capacidade aquisição eficiente deste íon é um importante mecanismo de virulência desempenhado pelas bactérias patogênicas (AMMENDOLA et al., 2007).

Proteínas ligantes a Zn, como sideróforos e metalóforos, capturam e adquirem Zn para o meio intracelular. Como exemplo a Coelibactina de *S. coelicolor* e a Estafilopina de *S. aureus*. Um número reduzido de patógenos desenvolveram mecanismos para obter metal diretamente de moléculas do hospedeiro, dentre eles *Nisseria meningitidis* captura por meio de sua proteína de membrana externa CbpA (proteína A de ligação à calprotectina) a calprotectina humana, adquirindo o Zn ali presente. Em leveduras a absorção de zinco é controlada em nível transcricional como resposta aos níveis intracelulares de zinco. Apresentando sistemas de alta e de baixa afinidade ao metal regulados através do controle de transcrição do gene *ZRT1* e *ZRT2*, respectivamente. O sistema de alta afinidade, em carência de zinco, é induzido mais de 30 vezes na célula (BLENCOWE; MORBY, 2003; BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000; WĄTŁY; POTOCKI; ROWIŃSKA-ŻYREK, 2016).

Outra estratégia empregada para contornar a baixa disponibilidade de zinco é a utilização celular de zinco e a reciclagem de zinco à nível basal. Para isso é necessário substituir as proteínas contendo zinco relativamente abundantes por seus parálogos funcionais livres de zinco. Esse mecanismo já está descrito em patógenos como Estreptococo do Grupo A (MAKTHAL; KUMARASWAMI, 2017).

Visto que o Zn é uma peça-chave na montagem de uma resposta imune efetora contra o patógeno, além de impor toxicidade ou inanição de Zn no patógeno invasor. O sequestro eficiente de Zn contribui fortemente para a virulência das bactérias certificando a sobrevivência dentro de seu hospedeiro e estabilização da infecção (CAPDEVILA; WANG; GIEDROC, 2016).

1.8.2 Sistemas de efluxo

A aquisição de micronutrientes como zinco, manganês e cobre e do macronutriente ferro são habilidades essenciais para a sobrevivência em todos os organismos. Todavia, muitos destes metais quando em excesso dentro das células tornam-se tóxicos seja por deslocarem equilíbrio de ligação de complexos comprometendo a atividade de enzimas, como acontece com o zinco, ou ainda pela produção de espécies reativas de oxigênio que provocam lesões em membranas, proteínas e no DNA podendo levar à morte celular, como acontece nos casos de excesso de ferro ou cobre (NIES, 2003). Diferente do ferro, o zinco apresenta característica redox inativo em condições fisiológicas, dessa forma não efetua o dano celular induzido por radicais livres (MARET, 2013). Apesar disso, o excesso de zinco pode ser tóxico para a célula, devida a ligação inapropriada (cognata) desde metal em sítios proteicos, levando a alterações desastrosas para a células (BOTELLA et al., 2012). Desta forma, as bactérias têm de ser capazes de regular finamente a captação, armazenagem e efluxo de metais de modo a manter o equilíbrio adequado de disponibilidade de tais metais. Conseqüentemente, o excesso de metais intracelular e a metalação de sensores de metais em demasia normalmente leva à expressão de genes relacionados a sistemas de efluxo e armazenamento (NIES, 2003).

Na maioria dos casos, o efluxo é a maquinaria mais vantajosa para as bactérias superarem rapidamente com a abundância de íons metálicos, sendo assim, os sistemas de efluxo simbolizam a maior classe de transporte ativo para resistência a metais (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000). Como grande exemplo temos o patógeno *B. subtilis*, o qual identifica o excesso de Zn com o auxílio do ativador transcricional CzrA (membro da família ArsR/SmtB). CzrA liga-se ao DNA atuando como um repressor em condições de escassez de íons metálicos reguladores. Em condição de abundância de zinco, a proteína CzrA perde a afinidade ao DNA permitindo a transcrição de dois sistemas de efluxo: da ATPase do tipo P chamada CadA e a difusão de cátions mediada pelo transportador CzcD, um transportador do facilitador de difusão. Como resultado, esse fator de transcrição atende às flutuações de Zn no interior da célula, garantindo níveis corretos de Zn para o patógeno (MOORE et al., 2005)

1.9 FATOR DE TRANSCRIÇÃO ZUR E A RESPOSTA A ZINCO

Sistemas de regulação responsivos a concentrações específicas de metais, permitem a expressão refinada dos sistemas de transporte de metais por bactérias nos diferentes nichos em que infectam. Garantindo assim a absorção de metal fisiologicamente necessária e controla

finamente a disponibilidade de metal no citoplasma bacteriano evitando a toxicidade. Uma das primeiras proteínas identificadas como envolvidas na regulação da captação de ferro, ocorreu na bactéria *Escherichia coli* e recebeu o nome de *Fur* (*Ferric Uptake Regulator*). Posteriormente, estudos demonstraram membros desta família de reguladores de transcrição que não respondiam à disponibilidade de ferro no ambiente, mas a outros sinais como disponibilidade de zinco recebendo o nome de *Zur* (*Zinc Uptake Regulator*), disponibilidade de manganês recebendo o nome de *Mur* (*Manganese Uptake Regulator*), disponibilidade de níquel recebendo o nome de *Nur* (*Nickel Uptake Regulator*) entre outros (LEE; HELMANN, 2007).

O parálogo de *Fur*, *Zur*, é uma proteína dimérica que possui sítio de Zn estrutural e sítio de detecção a Zn. *Zur* detecta as concentrações intracelulares de Zn causando alterações transcriptômicas relevantes. Sendo um regulador transcricional, *Zur* regula seus genes em regulon em resposta à ligação reversível a Zn. Este processo ocorre em duas etapas. Primeiro, em condições repletas de Zn, *Zur* em dímero se liga a um ou mais Zn reguladores, a depender do organismo, formando um repressor ativo e com alta afinidade por seu DNA cognato. Dessa forma, a Apo-*Zur* incorpora íons de Zn^{2+} formando a proteína holo-*zur* ajustando as concentrações de Zn intracelulares pela expressão de genes de captação e mobilização de Zn. Segundo, por outro lado, em condições de deficiência de Zn, *Zur* altera a sua conformação estrutural o que resulta no desligamento gradual de regiões promotoras, possibilitando a expressão de genes relacionados com sistemas de importação de zinco (FILLAT, 2014; LEE; HELMANN, 2007; PRESTEL; NOIROT; AUGER, 2015).

Reguladores transcricionais responsivos a metais homólogos a *Zur* são largamente presentes em bactéria. Uma vez ausentes, reguladores funcionais análogos usualmente manipulam um conjunto de genes semelhantes aos relacionados com *Zur*. Desta maneira a manutenção da homeostase de Zn por *Zur* não se resume no controle da expressão gênica de sistemas de aquisição de metais, e sim o processo global que envolve regulação de genes que codificam: Transportadores de Zn (baixa e alta afinidade), proteínas chaperonas, proteínas ribossomais não-parálogos de ligação ao Zn e diversas proteínas relacionadas com a homeostase do metal (FILLAT, 2014).

Apesar da importância do zinco e de se ter informações sobre o regulon *Zur* em diversas bactérias, como *Listeria monocytogenes*, *Haemophilus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Treponema pallidum* e *Neisseria gonorrhoeae* (revisado por (BLENCOWE; MORBY, 2003), pouco se sabe dele ao se tratar de *L. interrogans*.

1.10 ZUR E A BIOTECNOLOGIA

Os mecanismos de regulação homeostática específicos ao Zn controlarem finamente múltiplos sistemas de captação ou exportação como estratégia para a adaptação de patógenos em condições de carência e/ou abundância de nutrientes metálicos sem implicar na intoxicação de zinco é um mecanismo chave na interação patógeno-hospedeiro (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000). Devido a este fato, os patógenos são capazes de identificar com precisão as concentrações de metal disponíveis sendo de suma importância para a sua patogênese. Além disso, estudos evidenciam que além do papel crucial na manutenção dos níveis de Zn, a proteína Zur está envolvida direta ou indiretamente na virulência de patógenos bacterianos. Visto isso, grupos de pesquisa exploram a possibilidade de conduzir e explorar as vias de homeostase do Zn para o *screening* de novas terapias antimicrobianas para contornar a resistência contra antibióticos padrões já estabelecidos (WAŹŁY; POTOCKI; ROWIŃSKA-ŻYREK, 2016).

Como, por exemplo, um mutante da bactéria *Burkholderia cepacia* que possui resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos, canamicina e eritromicina, além dos metais cádmio e zinco (HAYASHI et al., 2000). Tudo isso levanta a importância de um melhor entendimento sobre a regulação de metais, tal como o zinco, em bactérias patogênicas e sua possível relação com resistência a antimicrobianos (CAILLE; ROSSIER; PERRON, 2007).

Porém, no momento em que realizada a prospecção de abordagens terapêuticas direcionadas a Zn, deve-se levar em conta a possibilidade de afetar seriamente o hospedeiro. Sendo assim, é de extrema importância estudos visando melhor compreender a homeostase e a atuação do Zn na relação patógeno-hospedeiro para o desenvolvimento de estratégias específicas contra os patógenos.

Outra área promissora na biotecnologia inclui a exploração de novas estratégias de vacinas direcionadas aos sistemas de aquisição de metal de zinco. De maneira evidente diversas características de sistemas de mobilização transportadores de zinco os tornam atrativos antígenos vacinais, dentre eles: Localização externa de receptores de superfície específicos responsáveis pela captação de metais, permitindo assim um fácil contato com as células do sistema imune, além da grande quantidade dos sistemas durante a infecção. Visto isso, a geração de anticorpos específicos contra proteínas do sistema de aquisição e extrusão de metais opsonizaria funções vitais do patógeno (ALTERI et al., 2009; BRUMBAUGH; SMITH; MOBLEY, 2013; WIESER et al., 2010).

Apesar da importância da homeostase de íons como ferro, zinco e manganês para a sobrevivência e virulência de bactérias patogênicas, evidenciada inclusive em grupos bastante aparentados dentro da ordem Spirochaetales (como em *Borrelia burgdorferi*) a qual pertence a bactéria *Leptospira interrogans*, pouco se sabe acerca dos mecanismos regulatórios envolvidos na homeostase de tais metais e da contribuição dos reguladores da família Fur para a patogênese provocada por esta bactéria. O estudo da resposta adaptativa à disponibilidade de zinco, bem como a identificação de reguladores transcricionais zinco-responsivos e do próprio regulon Zur podem fornecer informações relevantes para o melhor entendimento da fisiologia desta bactéria e dos processos envolvidos na virulência e patogênese, bem como novos fatores de virulência que, futuramente podem proporcionar abordagens propedêuticas e terapêuticas de maior eficiência.

2 HIPÓTESE

A mudança na disponibilidade de zinco no meio de cultura influencia a produção de proteínas de *L. interrogans* para garantir a sobrevivência e adaptação da bactéria a condição de stress. Esses resultados poderão auxiliar nossa compreensão da resposta bacteriana às mudanças nas condições ambientais e no curso da infecção, expondo proteínas essenciais para a remodelação fisiológica para uma resposta eficiente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as proteínas diferencialmente expressas de *L. Interrogans* em resposta disponibilidade e privação de Zn em condições de cultura.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil de crescimento das culturas de *L. interrogans* sv. Copenhageni em diferentes regimes de disponibilidade de zinco, determinado o intervalo de permissividade às concentrações do metal;
- Estudar a resposta traducional ao zinco através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (LC-MS);
- Identificar e caracterizar computacionalmente proteínas abundantes em *L. interrogans* sv. Copenhageni, submetidas ao déficit de zinco;
- Obter um panorama geral e classificar a função de proteínas diferencialmente expressas conforme o Clusters de Grupos Ortólogos de proteínas (COGs);
- Correlacionar às funções das proteínas identificadas com os aspectos fisiológicos da bactéria e sua importância.

4 METODOLOGIA

O desenho experimental utilizado para a realização do presente trabalho está representado na Figura 1 e foi dividido em: 1) Curva de crescimento, 2) Preparo das amostras para proteômica, 3) Análise por espectrometria de massas *in tandem* e 4) Análise dos dados. Os experimentos foram conduzidos nas dependências do Laboratório de Genética Molecular Bacteriana (GeMBac) situado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e as curvas de crescimento foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan em São Paulo, sob a supervisão da pesquisadora Dra. Ângela Silva Barbosa. As análises proteômicas foram realizadas pela empresa Veritas Biotecnologia.

Figura 1 - Fluxo metodológico básico utilizado para a realização do presente trabalho com enfoque na análise do proteoma de *L. interrogans* sob condições de meio limitado e repleto de zinco. Os dados foram processados e analisados usando as plataformas UniProt e R Studio.

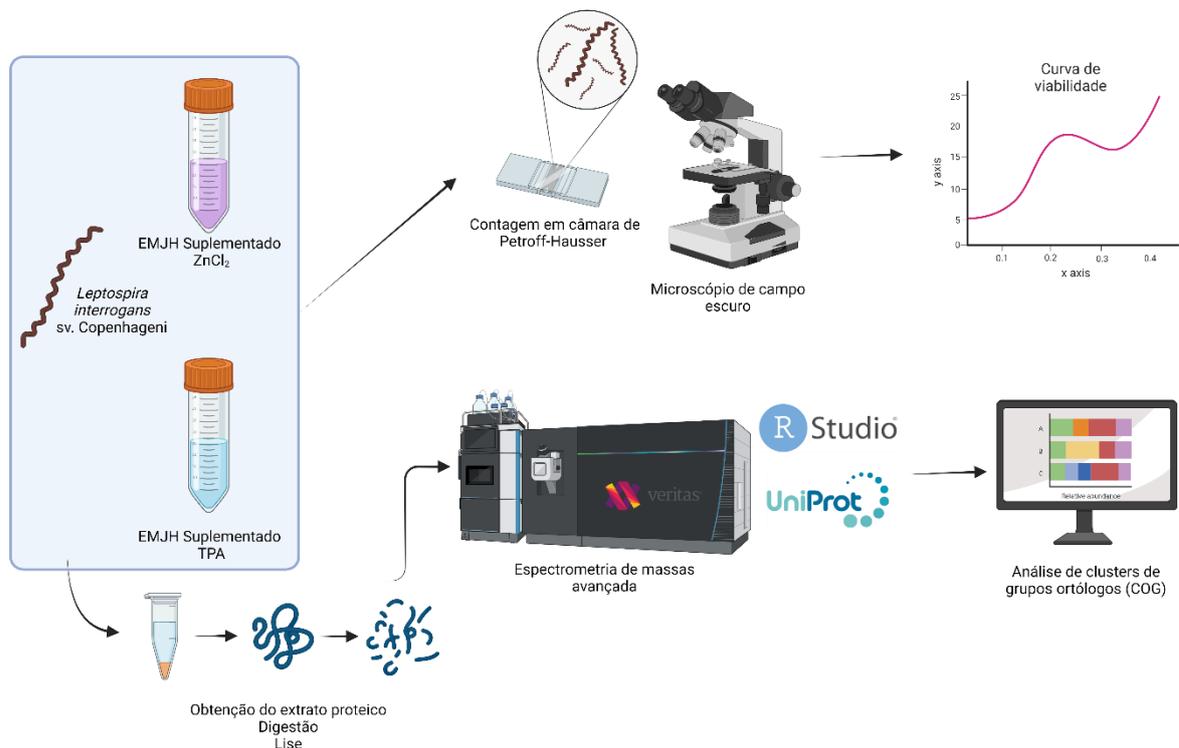


Figura produzida com Biorender.
Fonte: A autora (2022).

4.1 CEPAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A cepa de *L. interrogans* sv. *Copenhageni* str. 10A foi gentilmente cedida pela Dra. Ângela Silva Barbosa. As leptospiros foram cultivadas a 28 °C sob condições aeróbicas em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Difco) enriquecido com 10% de *Leptospira enrichment* EMJH (BD, Difco) ou 1% de soro de coelho inativado (Bionutrientes, Brasil) com verificação intermitente de crescimento e triagem para contaminação, se houver. Para experimentos que requerem plaqueamento, foi adicionado 0,6% de agarose (Sigma) no meio EMJH enriquecido. Para geração de excesso e quelação de zinco, $ZnCl_2$ e Tris (2-pyridylmethyl) amine (TPA) foram adicionados ao meio de crescimento nas concentrações especificadas em cada experimento. As cepas foram mantidas em no máximo 6 passagens *in vitro*.

4.2 CURVA DE VIABILIDADE

As curvas de crescimento confiáveis foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan em São Paulo, sob a supervisão da pesquisadora Dra. Ângela Silva Barbosa que gentilmente cedeu espaço, reagentes e instrumentos. Para isso foi utilizada microscopia de campo escuro fazendo uso de uma câmara de contagem Petroff-Hausser. Culturas foram obtidas em meio EMJH acrescido de $ZnCl_2$ em diferentes concentrações, bem como com a utilização de dois diferentes quelantes de zinco: EDDS e TPA. O inóculo inicial foi ajustado para $3,2 \times 10^6$ leptospiros/mL. Aliquotas da cultura eram tomadas a cada 24 h, colocadas na câmara no microscópio de campo escuro, as espiroquetas eram contadas e o número total de espiroquetas por unidade de volume era obtida segundo a fórmula: No. espiroquetas = $5000 \times 25 \times 25 \times MQ$, onde MQ é a somatória de todas as células contadas em todos os quadrantes utilizados.

Os valores de sobrevivência relativa foram obtidos dividindo-se o número de células contabilizadas em cada um dos pontos pelo número de células inicial. Nos gráficos, apenas a sobrevivência relativa a partir do primeiro ponto de tomada (24 h) foram plotados. Os valores são médias representativas das réplicas biológicas dos experimentos e seus respectivos desvios padrão. O número de células intactas sem qualquer distorção na morfologia, motilidade e tamanho foi contado como células viável. A porcentagem de perda na viabilidade celular de células interagidas com zinco ou quelante foi calculada em relação às células de controle (meio EMJH).

4.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE PROTEÔMICA

Para preparar um extrato celular total, a cepa *L. interrogans* sv. *Copenhageni* str. 10A foi cultivada meio EMJH suplementado com 10% de *Leptospira enrichment* EMJH (BD, Difco). As condições comparativas consistiram no crescimento da espiroqueta por 5 dias após atingir este tempo, foi adicionado separadamente as concentrações de 30uM e 25uM de TPA e ZnCl₂ respectivamente. As soluções foram filtradas com uma membrana de poro de 0,22 µm, antes de serem adicionadas ao meio. Após 18 h, as células foram precipitadas por centrifugação (3.000 rpm por 15 min) e o sedimento lavado três vezes, ressuspensão em tampão fosfato-salino (PBS). A reação foi centrifugada para separar o sobrenadante e o pellet que foi seco em Speed vac (Eppendorf). Para controlar as variações biológicas, técnicas e experimentais, as condições foram realizadas em triplicata. Amostras de proteínas totais foram submetidas a empresa Veritas Biotecnologia para análise por espectrometria de massas *in tandem*. Sendo assim, nossas condições experimentais foram meio limitado vs. repleto de zinco.

4.4 EXTRAÇÃO PROTEICA E QUANTIFICAÇÃO

Os pellets obtidos das condições comparativas foram ressuspensos em 200 uL de tampão de extração (uréia 8M, octylglucopiranosideo (OG) 0.5% e Tris-HCl 0,05 M pH 8.8). O extrato proteico foi considerado obtido após solubilização e agitação em vórtex. A concentração total de proteínas presente nas amostras foi determinada pelo emprego do método de Bradford com o reagente Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, cód. 500-0006, Lote L9700067 Rev J). A curva padrão foi realizada com diferentes diluições de BSA, preparada a partir de estoque adquirido comercialmente (Protein Standard 200mg/mL, Sigma, Cód. # P5369-10 mL Lote 110M6005). As amostras foram distribuídas nas microplacas em duplicatas de 1uL cada. A absorbância em 595 nm foi lida em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax Plus 384). Através dos dados obtidos na quantificação, foi estimada a concentração total de proteínas presentes nas amostras.

4.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS IN TANDEM.

A preparação da amostra para a espectrometria de massas *in tandem* consistiu basicamente de 3 etapas principais: i) redução e alquilação das proteínas, ii) digestão enzimática das proteínas com tripsina e iii) “clean up/desalting” das amostras. Todo o material obtido foi utilizado, contendo de 1 a 10ug. Em resumo, as amostras foram submetidas a redução das pontes

de dissulfeto das proteínas pela adição de 20ug de DTT (ditiotreitól) e incubação por 1 hora a 37°C seguida da alquilação pela adição de 100ug de I.A. (iodoacetamida) e incubação por 1 hora em temperatura ambiente, no escuro. O volume das amostras foi diluído 5 vezes com solução de Tris-HCl 0.05M pH 8.8. As amostras foram então incubadas com 2 µg de tripsina (Promega, V511A) à 37°C *overnight*. Previamente a aplicação das amostras no espectrômetro de massas foi realizado o “clean-up” / desalting” das amostras, utilizando-se resina C18 (Supelco). Brevemente, a coluna foi equilibrada com solução acetonitrila 2% contendo ácido fórmico 0,1% e a eluição do material de interesse foi realizada com acetonitrila 50%. As amostras foram em seguida secas em speed vac em tubos de baixa absorção de proteínas (ependorf) e aplicadas em espectrômetro de massas, conforme descrito a seguir.

4.6 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS IN TANDEM

Aproximadamente 2 ug de cada amostra digerida foi injetada para análise por espectrômetro de massas Orbitrap Eclipse (ThermoFisher) acoplado a um sistema de cromatografia nanoflow Nano LC-MS/MS (Dionex Ultimate 3000 RLSCnano System, Thermofisher) realizado pela empresa Veritas Biotecnologia. A separação dos peptídeos foi realizada em coluna Nanoease MZ peptide BEH C18 (130A, 1.7µm, 75µm x 250mm, Waters) 300 nL/min utilizando um gradiente de 4-50% de acetonitrile em 90 minutos. Os dados foram adquiridos no MS1 na faixa de m/z 375–1500 (120.000 de resolução, AGC target 1 E6 com tempo máximo de injeção de 100 ms). Os íons mais abundantes foram submetidos a MS/MS com energia de colisão de 30%, janela de isolamento da precursora de 1.2 m/z, AGC target 1E5 e resolução de 15.000. A análise de dados foi realizada primeiramente pela exportação de todos os conjuntos de dados brutos (arquivos.raw) convertidos a mzXML e processados utilizando o algoritmo Comet (v. 2018). As proteínas foram identificadas e os números de acesso foram atribuídos usando o banco de dados de (SwissProt junho 2021). Os peptídeos identificados que atingiram o critério máximo de 5% de erro pelo Peptide Prophet foram utilizados para a extração da intensidade para quantificação pelo algoritmo Xpress. Os dados derivados de espectrometria de massa foram pesquisados contra *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni (cepa Fiocruz L1–130) obtidos do NCBI (3667 entradas de proteínas).

4.7 ANÁLISE DE CLUSTERS DE GRUPOS ORTÓLOGOS (COG)

Para determinar as características funcionais das proteínas quantificadas e diferencialmente expressas, a sequência fasta das proteínas foi obtida diretamente do banco de dados *Uniprot* (<https://www.uniprot.org/>) e os clusters de grupos ortólogos (COG) preditos pelo web-server *Domain Analyser* (<https://depo.msu.ru/module/domainanalyser>). A anotação de COG foi baseada na versão mais atual disponível no momento da confecção deste trabalho (4.877 COGs disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>). Gráficos exibindo a variabilidade dos grupos funcionais COG de acordo com o grupo experimental foram gerados usando o pacote R. Para esta análise, a razão de abundância entre as condições (TPA/ZINCO) foi considerada maior que 1,75 e menor que 0,75, respectivamente.

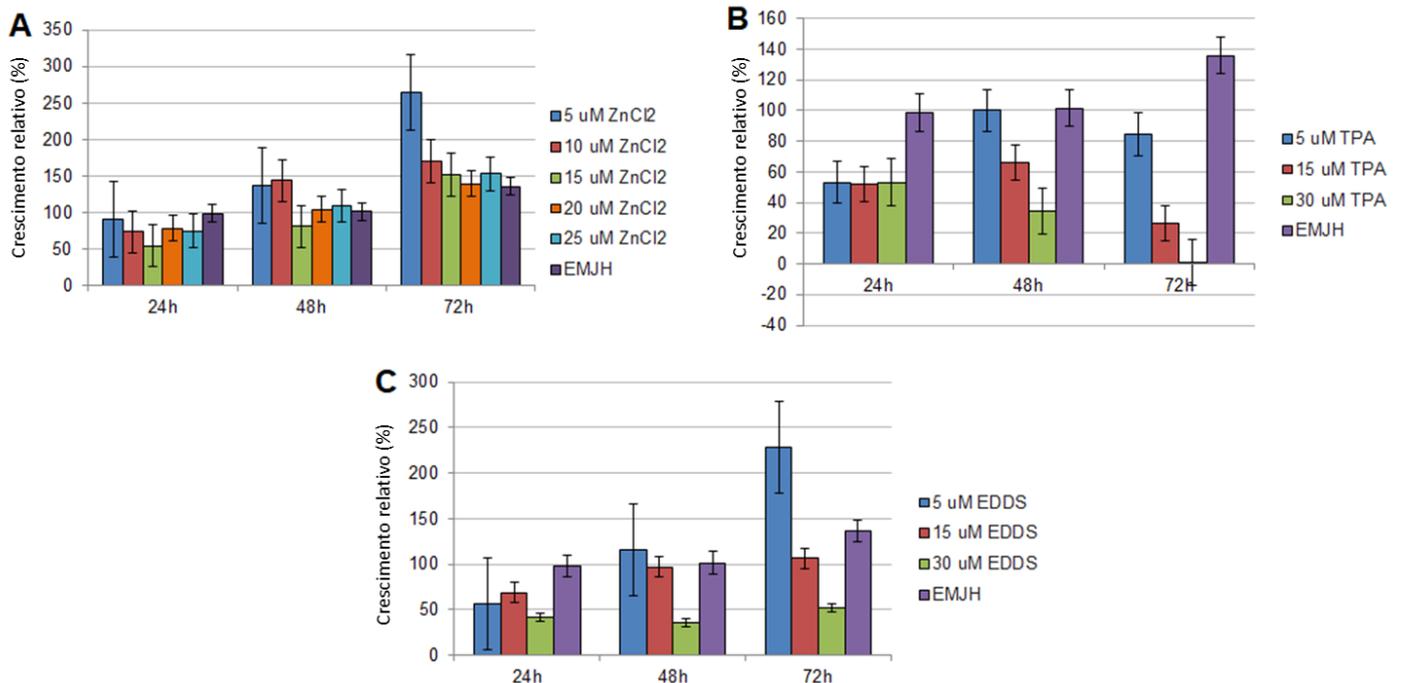
5 RESULTADOS

5.1 CURVA DE VIABILIDADE

Como primeiro passo para avaliar o perfil de sobrevivência de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa 10A durante a exposição ao zinco, foram realizados ensaios de viabilidade conforme descrito nos Materiais e Métodos. O perfil de crescimento do organismo foi estudado no meio EMJH (27 μ M de zinco) enriquecido com 10% de suplemento comercial, suplementado individualmente com diferentes concentrações de $ZnCl_2$ (5, 10, 15, 20 e 25 μ M). Agentes quelantes de zinco, EDDS e TPA (ambos a 5, 15 e 30 μ M), foram usados para simular uma condição de carência do metal.

Os resultados sugerem que a menor concentração de zinco (5 μ M) promoveu uma melhora no crescimento até 72 h quando comparado ao meio EMJH como pode ser observado na figura 2A. Para concentrações mais altas de zinco, as culturas exibem morte celular aumentada indicando toxicidade do composto ao longo das 72 h. Por outro lado, na figura 2B e 2C, nota-se que as concentrações dos dois agentes quelantes de zinco, TPA e EDDS, comprometeram fortemente o crescimento e a sobrevivência das bactérias. Todas as concentrações de quelante utilizadas resultaram em uma ligeira diminuição da viabilidade celular logo nas primeiras 24 h e morte celular proeminente após 48 h. A morte celular máxima ocorreu em 72 h na concentração de 30 μ M de TPA.

Figura 2 - Sobrevivência relativa de *L. interrogans* sv. Copenhageni str. 10A em diferentes regimes de disponibilidade de zinco.



As culturas sofram simultaneamente diluídas para o mesmo número inicial de células e cultivadas em meio EMJH sem aditivos, A) EMJH com adição de cloreto de zinco B) com adição de quelante TPA, C) com adição de quelante EDDS. O crescimento foi acompanhado até 72 h após a diluição. Os experimentos são médias de três ensaios biológicos.

Fonte: Autora (2022)

Portanto, os dados sugerem que as concentrações de zinco encontradas no meio EMJH não são as ótimas para o crescimento de *L. interrogans* e que esta bactéria tem sua viabilidade fortemente afetada pela carência de zinco. No entanto, para estudar o mecanismo de tolerância ao metal, proteínas diferencialmente expressas foram estudadas por espectrometria de massa.

5.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA

No presente estudo, avaliamos a influência da concentração de zinco no conjunto total de proteínas celulares de *L. interrogans* acessado por meio de análises proteômicas globais conduzidas a fim de investigar diretamente os perfis proteicos diferenciais resultantes da exposição de *L. interrogans* cultivada à disponibilidade limitada (30 μM TPA) e abundante (25 μM ZnCl_2) de zinco. As condições de estresse experimental foram realizadas em triplicatas biológicas. Os peptídeos resultantes foram analisados pela abordagem LC/MS-MS conforme descrito no item 6 da Seção Material e Métodos. Sabe-se, que em condições de infecção, o hospedeiro sequestra íons de zinco livres privando assim o patógeno de concentrações micronutriente vital (DESROSIERS et al., 2010). Sendo importante frisar que as condições comparativas nos permitem uma maior identificação do repertório completo de proteínas expressas de forma diferencial em resposta específica à carência e excesso deste metal. As duas condições visam reproduzir *in vitro*, o ambiente em que as espiroquetas encontram dentro de um hospedeiro.

A partir da abordagem de proteômica comparativa identificamos um total de 2161 proteínas no proteoma celular de *L. interrogans*. Das quais 163 proteínas estavam presentes apenas em TPA, 141 presentes apenas em zinco, 588 proteínas induzidas e 406 reprimidas na comparação dos grupos experimentais. O banco de dados de proteínas da cepa *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar copenhagense (Fiocruz L1-130) depositado no UniProt foi utilizado como referência. Após a triagem de proteínas identificadas em todas as réplicas biológicas, analisamos 513 proteínas.

A fim de avaliar e comparar o nível de expressão das proteínas entre as duas condições experimentais, os valores de *Fold Change* foram utilizados como parâmetro indicativo da diferença entre os níveis de expressão proteica. Lembrando que os critérios determinados para que a proteína seja considerada como significativamente alterada na expressão, foram: (I) a proteína demonstrou uma correspondência de banco de dados com uma proteína leptospira; (II) Teve razão de abundância entre as condições (TPA/ZINCO) maior que 1,5 e menor que 0,75, respectivamente (Fig. 3). A mudança média de vezes nos níveis de expressão, conforme determinado pelas análises variou de -5,863 a 17.667. Notavelmente, identificamos proteínas exclusivas para cada condição experimental: 318 proteínas em induzidas por zinco e 195 proteínas em reprimidas por zinco.

Figura 3 - Perfil do proteoma celular de *L. interrogans* cultivada em meio limitado e rico em zinco

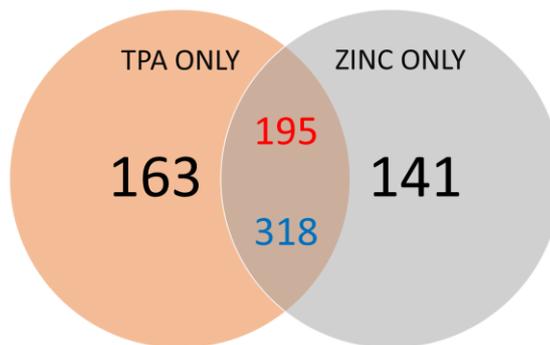


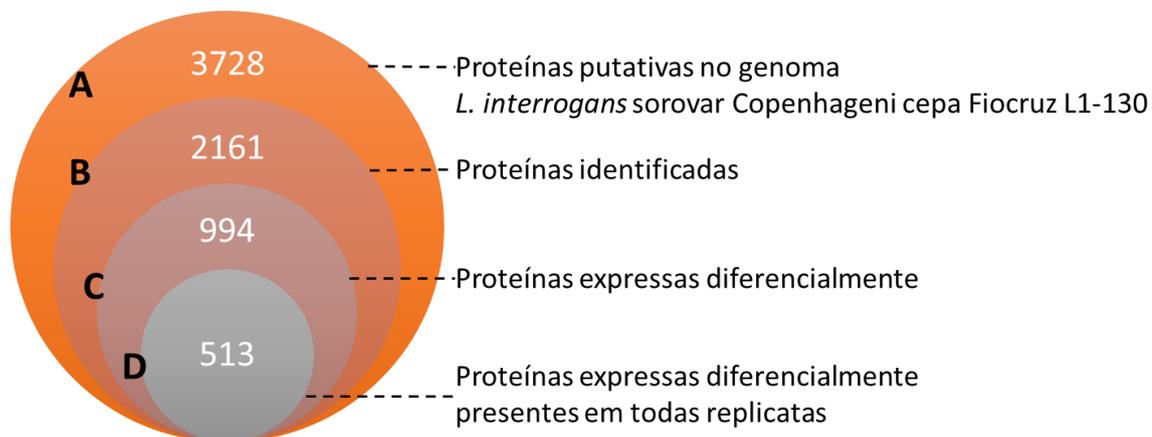
Diagrama de Venn representando proteínas totais presentes em todas as replicatas. Proteínas induzidas (azul, 318) e proteínas reprimidas por zinco (vermelha, 195).

Fonte: Autora (2022).

O número total de proteínas detectadas em cada condição experimental, juntamente com os clusters de proteínas com níveis aumentados e diminuídos, está listado na Tabela 1. Outro ponto de vista que podemos comparar e observar o número de proteínas identificadas por espectrometria de massas é a partir do proteoma total de *L. interrogans*. Segundo Nascimento e colaboradores, 2004, a estirpe *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 possui 3728 ORFs para proteínas expressas no seu genoma (NASCIMENTO, 2004). Neste trabalho, identificamos 2161 proteínas que corresponde a 58% das proteínas preditas no genoma. Destas identificadas, 994 foram expressas diferencialmente entre as condições comparativas e 513 estão presentes em todas as replicatas biológicas. A figura 4 demonstra um

diagrama contendo a triagem das proteínas até o número final de proteínas utilizadas nas demais análises.

Figura 4 - Diagrama de Venn referente as proteínas identificadas e quantificada



No círculo laranja maior (A) os genes codificantes para proteínas putativas no genoma de *L. interrogans*. (B) Proteínas identificadas por espectrometria de massas no presente trabalho. (C) Proteínas diferencialmente expressas entre as condições TPA/zinco e (D) Proteínas diferencialmente expressas encontradas em todas as três replicatas biológicas.

Fonte: A autora (2022).

Tabela 1 – Proteínas diferencialmente expressas entre carência e abundância de zinco (TPA/ZnCl₂).

ORF <i>L. interrogans</i>	ORF <i>L. manilae</i>	ORF <i>L. manilae</i>	Código Uniprot	COG	Fold >2<0,5	Proteínas de <i>L. interrogans</i> sv. Copenhageni diferencialmente expressas em resposta ao zinco identificadas por MS.
INDUZIDAS						
LIC12161	LMANV2_660046	LIMLP_10700	Q72QF1	COG0363	17.667	6-phosphogluconolactonase
LIC12600	LMANV2_80045	LIMLP_13010	Q72P76		5.706	hypothetical protein
LIC11834	LMANV2_340045	LIMLP_09115	Q72RB4	COG4254	4.886	LipL45-related lipoprotein
LIC11377	LMANV2_150084	LIMLP_06720	Q72SK4	COG1419	4.807	flagellar biosynthesis protein FlhF
LIC13022	LMANV2_220039	LIMLP_02330	Q72N16	COG3876	4.651	DUF1343 domain-containing protein
LIC10327	LMANV2_60110	LIMLP_16125	Q72VH0	COG4798	3.774	methyltransferase domain-containing protein
LIC11452	LMANV2_510013	LIMLP_07075	Q72SD2	COG0708	3.716	exodeoxyribonuclease III
LIC13416	LMANV2_470041	LIMLP_17420	Q72LX7	COG3329	3.521	sodium-dependent bicarbonate transport family permease
LIC12718	LMANV2_320007	LIMLP_03880	Q72NW0	COG4229	3.375	acireductone synthase
LB340a			D4YW52	COG4575	3.299	Uncharacterized protein
LIC13449	LMANV2_470076	LIMLP_17580	Q72MJ5	COG1699	3.243	flagellar assembly protein FliW
LIC10631	LMANV2_170022	LIMLP_14580	Q72UM6	COG0396	3.214	Fe-S cluster assembly ATPase SufC
LIC10231	LMANV2_60010	LIMLP_16595	Q72VR5		3.168	hypothetical protein
LIC11860	LMANV2_340020	LIMLP_09240	Q72R88	COG2084	3.102	NAD(P)-dependent oxidoreductase
LIC20113	LMANV2_180008	LIMLP_18420	Q75FR8	COG2770	3.077	methyl-accepting chemotaxis protein
LA0268			Q8F9C7		3.031	Uncharacterized protein
LIC11122	LMANV2_360022	LIMLP_05435	Q72T99	COG4254	3.021	LipL45-related lipoprotein
LIC10678	LMANV2_170074	LIMLP_14345	Q72UH9	COG2208	2.959	response regulator
LIC12886	LMANV2_240189	LIMLP_03000	P62038	COG0217	2.908	YebC/PmpR family DNA-binding transcriptional regulator
LIC13144	LMANV2_20016	LIMLP_01725	Q72MP9		2.872	hypothetical protein

LIC10351	LMANV2_60136	LIMLP_16010	Q72VE7	COG1131	2.862	ABC transporter ATP-binding protein
LIC11766	LMANV2_490042	LIMLP_08765	Q72RH9	COG1109	2.854	phospho-sugar mutase
LIC13182	LMANV2_450022	LIMLP_01550	Q72ML1	COG0584	2.836	glycerophosphodiester phosphodiesterase
LIC13183	LMANV2_450023	LIMLP_01545	Q72ML0		2.792	hypothetical protein
LIC10317	LMANV2_60099	LIMLP_16180	Q72VI0	COG0698	2.770	ribose 5-phosphate isomerase B
LIC13026	LMANV2_220043	LIMLP_02315	Q72N12	COG0693	2.740	DJ-1/PfpI family protein
LIC10064	LMANV2_100047	LIMLP_00350	Q72W73	COG4731	2.725	DUF2147 domain-containing protein
LIC10523	LMANV2_300062	LIMLP_15120	P61440	COG0484	2.694	molecular chaperone DnaJ
LIC12848	LMANV2_240146	LIMLP_03205	Q72NI6	COG0100	2.606	30S ribosomal protein S11
LIC12414	LMANV2_500027	LIMLP_12020	Q72PQ4		2.601	hypothetical protein
LIC12648	LMANV2_80100	LIMLP_13255	Q72P28	COG0386	2.558	glutathione peroxidase
LIC10608	LMANV2_740016	LIMLP_14705	Q72UP9	COG0466	2.555	endopeptidase La
LIC12172	LMANV2_660062	LIMLP_10765	Q72QE0	COG0381	2.549	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (hydrolyzing)
LIC12780	LMANV2_240067	LIMLP_03560	Q72NQ2	COG3865	2.543	VOC family protein
LIC12955	LMANV2_70041	LIMLP_02660	Q72N82	COG1762	2.531	PTS sugar transporter subunit IIA
LIC11726	LMANV2_670001	LIMLP_08570	Q72RL9	COG0119	2.517	2-isopropylmalate synthase
LIC12193	LMANV2_660087	LIMLP_10890	Q72QB9	COG5285	2.509	hypothetical protein
LIC12776	LMANV2_240065	LIMLP_03575	Q72NQ4	COG0261	2.508	50S ribosomal protein L21
LIC12417	LMANV2_500030	LIMLP_12035	Q72PQ1	COG1160	2.497	GTPase Der
LIC11948	LMANV2_290076	LIMLP_09710	Q72R04		2.497	DUF4416 family protein
LIC13065	LMANV2_560001	LIMLP_02110	Q72MX4		2.493	DUF2804 domain-containing protein
LIC10711	LMANV2_170110	LIMLP_14180	Q72UE6	COG3489	2.492	hypothetical protein
LIC10787	LMANV2_260045	LIMLP_13780	Q72U75		2.476	endoflagellar filament sheath protein
LIC10549	LMANV2_130048	LIMLP_14990	Q72UV8	COG0127	2.390	non-canonical purine NTP pyrophosphatase
LIC10157	LMANV2_370087	LIMLP_00820	Q72VY8	COG0706	2.389	membrane protein insertase YidC
LIC20144	LMANV2_180042	LIMLP_18575	Q75FN8	COG0265	2.378	PDZ domain-containing protein
LIC10318	LMANV2_60100	LIMLP_16175	Q72VH9		2.366	hypothetical protein
LIC12108	LMANV2_650017	LIMLP_10425	Q72QK5	COG0173	2.348	aspartate--tRNA ligase
LIC11737	LMANV2_490012	LIMLP_08625	Q72RK8	COG0714	2.318	MoxR family ATPase

LIC10482	LMANV2_300022	LIMLP_15305	Q72V21		2.316	hypothetical protein
LIC12580	LMANV2_80021	LIMLP_12920	Q72P95		2.306	hypothetical protein
LIC11329	LMANV2_150135	LIMLP_06510	Q72SP6	COG1295	2.306	hypothetical protein
LIC11538		LIMLP_07505	Q72S48	COG2870	2.290	D-glycero-beta-D-manno-heptose-7-phosphate kinase
LIC11716	LMANV2_670011	LIMLP_08520	Q72RM9		2.273	hypothetical protein
LIC20026	LMANV2_90126	LIMLP_17945	Q75G18	COG4221	2.264	SDR family oxidoreductase
LIC10123	LMANV2_370120	LIMLP_00655	Q72W18	COG4254	2.254	sigma factor regulatory protein FecR
LIC10521	LMANV2_300059	LIMLP_15130	Q72UY2	COG1678	2.252	YqgE/AlgH family protein
LIC12207	LMANV2_380021	LIMLP_10955	Q72QA5		2.229	hypothetical protein
LIC12540	LMANV2_410070	LIMLP_12700	Q72PD1	COG1862	2.211	preprotein translocase subunit YajC
LIC12568	LMANV2_80008	LIMLP_12855	Q72PA6		2.199	hypothetical protein
LIC13326	LMANV2_330110	LIMLP_17005	Q72M65	COG0105	2.162	nucleoside-diphosphate kinase
LIC12164	LMANV2_660051	LIMLP_10715	Q72QE8	COG2227	2.158	class I SAM-dependent methyltransferase
LIC12942	LMANV2_70026	LIMLP_02730	Q72N94	COG2172	2.145	anti-sigma regulatory factor
LIC12275	LMANV2_750003	LIMLP_11295	Q72Q39	COG0345	2.130	pyrroline-5-carboxylate reductase
LIC13464	LMANV2_470090	LIMLP_17650	Q72LT5	COG2317	2.124	carboxypeptidase M32
LIC11950	LMANV2_290078	LIMLP_09720	Q72R02		2.118	hypothetical protein
LIC10877	LMANV2_80106	LIMLP_13290	Q72TY7	COG2010	2.108	cytochrome c
LIC10586	LMANV2_130012	LIMLP_14820	Q72US1	COG0749	2.106	DNA polymerase I
LIC20217	LMANV2_90022	LIMLP_18970	Q75FH2	COG0848	2.105	biopolymer transporter ExbD
LIC11065	LMANV2_120058	LIMLP_05150	Q72TF6	COG0617	2.097	polynucleotide adenylyltransferase PcnB
LIC10557	LMANV2_130041	LIMLP_14950	Q72UV0	COG0745	2.092	response regulator
LIC11310	LMANV2_150157	LIMLP_06430	Q72SR5	COG2193	2.091	bacterioferritin
LIC11140	LMANV2_360004	LIMLP_05525	Q72T81	COG3345	2.086	glycosyl hydrolase
LIC12614	LMANV2_80060	LIMLP_13080	Q72P62		2.081	hypothetical protein
LIC11553	LMANV2_590044	LIMLP_07580	Q72S33	COG2815	2.072	PASTA domain-containing protein
LIC10718	LMANV2_170118	LIMLP_14140	Q72UD9	COG0277	2.071	FAD-binding oxidoreductase
LIC11320	LMANV2_150147	LIMLP_06470	Q72SQ5		2.046	hypothetical protein
LIC11811	LMANV2_340069	LIMLP_08990	Q72RD5	COG0189	2.038	bifunctional glutamate--cysteine ligase GshA/ GshB

LIC10115	LMANV2_370129	LIMLP_00610	Q72W26	COG1651	2.017	hypothetical protein
LIC10451	LMANV2_30009	LIMLP_15485	Q72V52		2.012	hypothetical protein
LIC11241	LMANV2_810006	LIMLP_06065	Q72SY1	COG0056	2.009	ATP synthase subunit alpha

REPRIMIDAS

LIC11679	LMANV2_10008	LIMLP_08185	Q72RR3	COG3688	0.495	NYN domain-containing protein
LIC12901	LMANV2_40014	LIMLP_02930	Q72ND3	COG4886	0.494	DUF4132 domain-containing protein
LIC20270	LMANV2_90094	LIMLP_19270	Q75FC4		0.493	hypothetical protein
LIC11009	LMANV2_480007	LIMLP_04845	Q72TK9		0.492	hypothetical protein
LIC10048	LMANV2_100067	LIMLP_00255	P62371	COG0124	0.490	histidine--tRNA ligase
LIC11739	LMANV2_490014	LIMLP_08635	Q72RK6	COG2373	0.487	hypothetical protein
LIC11499	LMANV2_440011	LIMLP_07300	Q72S85		0.487	hypothetical protein
LIC12786	LMANV2_240073	LIMLP_03530	Q72NP6	COG0134	0.486	indole-3-glycerol-phosphate synthase
LIC11601	LMANV2_140003	LIMLP_07805	Q72RY7	COG1220	0.483	HslU--HslV peptidase ATPase subunit
LIC12845	LMANV2_240143	LIMLP_03220	Q72NI9	COG0203	0.481	50S ribosomal protein L17
LIC10102	LMANV2_100009	LIMLP_00540	Q72W38	COG0216	0.473	peptide chain release factor 1
LIC12026	LMANV2_280039	LIMLP_10115	Q72QT3	COG0190	0.473	bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase
LIC11919	LMANV2_290048	LIMLP_09570	Q72R32	COG0516	0.472	IMP dehydrogenase
LIC20240	LMANV2_90054	LIMLP_19095	Q75FF3		0.471	DUF2505 family protein
LIC10415	LMANV2_230008	LIMLP_15690	Q72V86		0.470	hypothetical protein
LIC11444	LMANV2_150005	LIMLP_07050	Q72SD9	COG3706	0.469	diguanylate cyclase response regulator
LIC20196	LMANV2_270002	LIMLP_18855	Q75FI8		0.466	hypothetical protein
LIC12745	LMANV2_240031	LIMLP_03740	Q72NT4	COG1905	0.466	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoE
LIC11550	LMANV2_590041	LIMLP_07565	Q72S36		0.465	hypothetical protein
LIC11545	LMANV2_590036	LIMLP_07540	Q72S41	COG1508	0.463	RNA polymerase sigma-54 factor
LA_1273			Q8F6N0		0.463	Uncharacterized protein
LIC11750	LMANV2_490025	LIMLP_08690	Q72RJ5		0.461	DUF4254 domain-containing protein
LIC10512			Q72UZ1		0.460	Uncharacterized protein

LIC11559	LMANV2_590051	LIMLP_07610	Q72S27	COG0335	0.459	50S ribosomal protein L19
LIC10364	LMANV2_60149	LIMLP_15945	Q72VD4	COG4122	0.459	O-methyltransferase
LIC12292	LMANV2_750018	LIMLP_11375	Q72Q22	COG0041	0.458	5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide mutase
LIC11091	LMANV2_120030	LIMLP_05275	Q72TD0		0.455	sulfate transporter
LIC11822	LMANV2_340057	LIMLP_09050	Q72RC4	COG0065	0.454	3-isopropylmalate dehydratase large subunit
LIC11990	LMANV2_280081	LIMLP_09925	Q72QW8		0.454	tetratricopeptide repeat protein
LIC12328	LMANV2_780005	LIMLP_11600	Q72PY7	COG0346	0.453	VOC family protein
LA_0484			Q8F8S0	COG2378	0.452	Transcriptional regulator
LIC12269	LMANV2_460003	LIMLP_11270	Q72Q44	COG0482	0.452	tRNA 2-thiouridine (34) synthase MnmA
LIC10851	LMANV2_110020	LIMLP_13435	Q72U13	COG0264	0.448	elongation factor Ts
LIC12847	LMANV2_240145	LIMLP_03210	Q72NI7	COG0522	0.448	30S ribosomal protein S4
LIC10955	LMANV2_50025	LIMLP_04570	Q72TR2	COG0821	0.445	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (flavodoxin)
LIC11971	LMANV2_820003	LIMLP_09830	Q72QY6	COG1259	0.444	hypothetical protein
LIC10679	LMANV2_170075	LIMLP_14340	Q72UH8	COG0152	0.441	phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase
LIC11859	LMANV2_340021	LIMLP_09235	Q72R89	COG1463	0.441	MCE family protein
LIC12465	LMANV2_520021	LIMLP_12290	Q72PK6	COG0441	0.436	threonine--tRNA ligase
LIC11175	LMANV2_410023	LIMLP_05685	Q72T46	COG0182	0.431	S-methyl-5-thioribose-1-phosphate isomerase
LIC13009	LMANV2_220023	LIMLP_02385	Q72N29	COG1960	0.423	acyl-CoA dehydrogenase
LIC12538	LMANV2_410072	LIMLP_12690	Q72PD3	COG0342	0.421	protein translocase subunit SecD
LIC10931	LMANV2_50048	LIMLP_04450	Q72TT6	COG0732	0.420	restriction endonuclease subunit S
LIC12495	LMANV2_200018	LIMLP_12465	Q72PH6	COG1024	0.419	crotonase
LIC10929	LMANV2_50050	LIMLP_04440	Q72TT8	COG0610	0.418	type I restriction endonuclease subunit R
LIC10020	LMANV2_100099	LIMLP_00100	Q72WB7	COG0009	0.415	threonylcarbamoyl-AMP synthase
LIC12171	LMANV2_660060	LIMLP_10760	Q72QE1		0.409	CBS domain-containing protein
LIC11162			Q72T59	COG1208	0.408	Uncharacterized protein
LIC12765	LMANV2_240054	LIMLP_03630	Q72NR4	COG2077	0.407	2-Cys peroxiredoxin
LIC12849	LMANV2_240147	LIMLP_03200	Q72NI5	COG0099	0.406	30S ribosomal protein S13
LIC10233	LMANV2_60012	LIMLP_16585	Q72VR3	COG1136	0.402	ABC transporter ATP-binding protein
LIC12459	LMANV2_500077	LIMLP_12265	Q72PL2	COG3027	0.401	cell division protein ZapA

LIC13324	LMANV2_330112	LIMLP_16995	P61524	COG0137	0.396	argininosuccinate synthase
LIC10268	LMANV2_60039	LIMLP_16455	Q72VM9	COG0664	0.392	Crp/Fnr family transcriptional regulator
LIC12937	LMANV2_70022	LIMLP_02745	Q72N99	COG1366	0.391	anti-sigma factor antagonist
LIC11096	LMANV2_120025	LIMLP_05300	Q72TC5	COG2350	0.388	hypothetical protein
LIC20214	LMANV2_90019	LIMLP_18955	Q75FH5	COG4771	0.380	TonB-dependent receptor
LIC11776	LMANV2_490052	LIMLP_08810	Q72RG9	COG2755	0.379	SGNH hydrolase
LIC13361	LMANV2_330068	LIMLP_17175	Q72M30	COG5316	0.379	DUF4139 domain-containing protein
LIC12109	LMANV2_650016	LIMLP_10430	Q72QK4	COG0305	0.377	replicative DNA helicase
LIC11246	LMANV2_160002	LIMLP_06090	Q72SX6		0.377	hypothetical protein
LIC12862	LMANV2_240158	LIMLP_03135	Q72NH2	COG0198	0.375	50S ribosomal protein L24
LIC12156	LMANV2_660042	LIMLP_10680	Q72QF6	COG0673	0.370	gfo/Idh/MocA family oxidoreductase
LIC12561	LMANV2_410046	LIMLP_12820	Q72PB1		0.369	hypothetical protein
LIC11854	LMANV2_340026	LIMLP_09210	Q72R94	COG2227	0.369	methionine biosynthesis protein MetW
LIC11334	LMANV2_150130	LIMLP_06535	Q72SP3	COG2968	0.368	DUF541 domain-containing protein
LIC10752	LMANV2_260007	LIMLP_13950	Q72UA9	COG0222	0.368	50S ribosomal protein L7/L12
LIC20223	LMANV2_90028	LIMLP_19000	Q75FG6		0.367	hypothetical protein
LIC11201	LMANV2_540013	LIMLP_05835	Q72T20	COG0784	0.363	response regulator
LIC11803	LMANV2_340077	LIMLP_08950	Q72RE3	COG1249	0.363	dihydrolipoyl dehydrogenase
LIC20115	LMANV2_180010	LIMLP_18430	Q75FR6	COG1595	0.356	sigma-70 family RNA polymerase sigma factor
LIC11247	LMANV2_160003	LIMLP_06095	Q72SX5	COG2203	0.351	hypothetical protein
LIC12637	LMANV2_80087	LIMLP_13195	Q72P39	COG0254	0.350	50S ribosomal protein L31
LIC13083	LMANV2_560020	LIMLP_02030	Q72MV6		0.349	hypothetical protein
LIC10766	LMANV2_260025	LIMLP_13875	Q72U95		0.346	lipoprotein
LIC13282	LMANV2_330014	LIMLP_16790	Q72MA6	COG0272	0.343	DNA ligase (NAD(+)) LigA
LIC20005	LMANV2_90103	LIMLP_17825	Q75G10	COG2107	0.343	hypothetical protein
LIC13463	LMANV2_470089	LIMLP_17645	Q72LT6		0.340	hypothetical protein
LIC13392	LMANV2_470013	LIMLP_17310	Q72UH9	COG2208	0.336	hypothetical protein
LIC12857	LMANV2_240154	LIMLP_03160	Q72NH7	COG0256	0.333	50S ribosomal protein L18
LIC20082	LMANV2_90197	LIMLP_18255	Q75FU9	COG2226	0.328	methyltransferase domain-containing protein

LIC10713	LMANV2_170112	LIMLP_14170	Q72UE4	COG3487	0.327	peptidase M75
LIC10475	LMANV2_300015	LIMLP_15340	Q72V28	COG0724	0.327	RNA-binding protein
LIC10632	LMANV2_170023	LIMLP_14575	Q72UM5	COG0719	0.319	Fe-S cluster assembly protein SufD
LIC11418	LMANV2_150036	LIMLP_06920	Q72SG5	COG1219	0.312	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX
LIC12320	LMANV2_620009	LIMLP_11550	Q72PZ5	COG1028	0.312	glucose 1-dehydrogenase
LIC10565	LMANV2_130032	LIMLP_14910	Q72UU2	COG1024	0.305	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
LIC13438	LMANV2_470064	LIMLP_17530	Q72LV5	COG0634	0.302	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
LIC11994	LMANV2_280077	LIMLP_09945	Q72QW4	COG2050	0.296	PaaI family thioesterase
LIC11284	LMANV2_160047	LIMLP_06295	Q72ST9	COG1359	0.288	antibiotic biosynthesis monooxygenase
LIC11311	LMANV2_150156	LIMLP_06435	Q72SR4	COG0183	0.271	thiolase family protein
LIC11529	LMANV2_590021	LIMLP_07465	Q72S57	COG0761	0.255	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase
LA0858			Q8F7T6		0.238	Putative lipoprotein
LIC12868	LMANV2_240164	LIMLP_03105	Q72NG6	COG0091	0.237	50S ribosomal protein L22
LIC11808	LMANV2_340072	LIMLP_08975	Q72RD8	COG0271	0.231	BolA family transcriptional regulator
LIC11062	LMANV2_120061	LIMLP_05135	Q72TF9	COG2227	0.226	class I SAM-dependent methyltransferase
LIC12681	LMANV2_320045	LIMLP_04065	Q72NZ6	COG3123	0.221	pyrimidine/purine nucleoside phosphorylase
LIC12576	LMANV2_80017	LIMLP_12900	Q72P99	COG4991	0.207	hypothetical protein
LIC12707	LMANV2_320019	LIMLP_03940	Q72NX1	COG0779	0.170	ribosome assembly cofactor RimP
LA2876			Q8F2A0	COG1406	0.162	CheX domain-containing protein
LIC13360	LMANV2_330069	LIMLP_17170	Q72M31	COG5316	0.118	mucoidy inhibitor MuiA family protein
LIC11656	LMANV2_10031	LIMLP_08080	Q72RT4	COG0299	0.114	phosphoribosylglycinamide formyltransferase

Fonte: A autora (2022)

Tabela 2 – Proteínas expressas exclusivamente na presença de zinco

ORF <i>L. interrogans</i>	ORF <i>L. manilae</i>	ORF <i>L. manilae</i>	Código Uniprot	COG	Proteínas de <i>L. interrogans</i> sv. Copenhageni presente exclusivamente no cultivo com zinco e identificadas por MS
ZINC ONLY					
LIC_11073	LMANV2_120049	LIMLP_05190	Q72TE8	COG0590	tRNA(Arg) A34 adenosine deaminase TadA
LIC_13178	LMANV2_450017	LIMLP_01570	Q72ML5	COG0451	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerase
LIC_12964	LMANV2_70052	LIMLP_02615	Q72N73	COG0614	ABC-type Fe ³⁺ -hydroxamate transport system, periplasmic component
LIC_10637	LMANV2_170029	LIMLP_14550	Q72UM0	COG1648	Siroheme synthase (precorrin-2 oxidase/ferrochelataze domain)
LIC_10336	LMANV2_60118	LIMLP_16085	Q72VG1	COG0824	Acyl-CoA thioesterase FadM
LA_1259			Q8F6P4	COG2949	Unch. periplasmic protein SanA, affects mem. permeability for vancomycin
LIC_10828			Q72U36		Uncharacterized protein
LIC_20017	LMANV2_90114	LIMLP_17885	Q75FZ8		Protoporphyrinogen oxidase
LIC_20232	LMANV2_90041	LIMLP_19050	Q75FF8	COG1256	Flagellar hook-associated protein FlgK
LIC_10034	LMANV2_100082	LIMLP_00180	Q72WA3	COG1254	Acylphosphatase
LIC_11846	LMANV2_340034	LIMLP_09170	Q72RA2	COG2353	Polyisoprenoid-binding periplasmic protein YceI
LIC_20054	LMANV2_90157	LIMLP_18095	Q75FX7		Dinucleotide-binding protein
LIC_11496	LMANV2_440014	LIMLP_07285	Q72S88	COG0399	dTDP-4-amino-4,6-dideoxygalactose transaminase
LIC_12494	LMANV2_200015	LIMLP_12455	Q72PH7	COG5002	Sensor histidine kinase Walk
LIC_11027	LMANV2_350020	LIMLP_04960	Q72TJ4		DUF192 domain-containing protein
LIC_13055	LMANV2_420011	LIMLP_02155	Q72MY4	COG1028	NAD(P)-dependent dehydrogenase, short-chain alcohol dehydrogenase
LIC_10281	LMANV2_60055	LIMLP_16380	Q72VL6	COG0379	Quinolinate synthase
LIC_20088	LMANV2_90203	LIMLP_18285	Q75FU3		hypothetical protein
LIC_20195	LMANV2_270003	LIMLP_18850	Q75FI9		ATP-dependent 6-phosphofructokinase
LIC_13118	LMANV2_20047	LIMLP_01875	Q72MS4	COG2197	DNA-binding response regulator, NarL/FixJ family, REC and HTH domains

LIC_11200	LMANV2_540012	LIMLP_05830	Q72T21		DegT/DnrJ/EryC1/StrS family aminotransferase
LIC_12524	LMANV2_200051	LIMLP_12620	Q72PE7	COG0123	Acetoin utilization deacetylase AcuC or a related deacetylase
LIC_20033	LMANV2_90133	LIMLP_17985	Q75G32	COG0130	tRNA U55 pseudouridine synthase TruB, may also work on U342 of tmRNA
LIC_13451	LMANV2_470078	LIMLP_17590	Q72MJ3	COG1487	Ribonuclease/mRNA interferase VapC, contains PIN domain
LIC_11524	LMANV2_590015	LIMLP_07440	Q72S62		flagellar hook-associated protein FlgK
LIC_11996	LMANV2_280075	LIMLP_09955	Q72QW2	COG3568	Metal-dependent hydrolase, endonuclease/exonuclease/phosphatase family
LIC_12005	LMANV2_280067	LIMLP_09995	Q72QV3		Hypothetical protein
LIC_12246	LMANV2_460027	LIMLP_11145	Q72Q66	COG2814	Predicted arabinose efflux permease AraJ, MFS family
LIC_12703	LMANV2_320023	LIMLP_03960	Q72NX5	COG0210	Superfamily I DNA or RNA helicase
LIC_11837	LMANV2_340042	LIMLP_09130	Q72RB1	COG2518	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase
LIC_11061	LMANV2_120064	LIMLP_05130	Q72TG0	COG2067	Long-chain fatty acid transport protein
LIC_10192	LMANV2_370041	LIMLP_01020	Q72VV4	COG1430	Uncharacterized conserved membrane protein, UPF0127 family
LA_0714			Q8F845		RluA family pseudouridine synthase
LIC_11278	LMANV2_160038	LIMLP_06255	Q72SU5	COG2194	Phosphoethanolamine transferase for periplasmic glucans OpgE, AlkP
LIC_13287	LMANV2_330009	LIMLP_16815	Q72MA1	COG1309	DNA-binding protein, AcrR family, nucleoid occlusion protein SlmA
LIC_12550	LMANV2_410060	LIMLP_12755	Q72PC2		SanA-like protein
LIC_13003	LMANV2_220017	LIMLP_02415	Q72N35		Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase
LIC_11383	LMANV2_150078	LIMLP_06750	Q72SJ8	COG0324	tRNA A37 N6-isopentenyltransferase MiaA
LIC_11759	LMANV2_490036	LIMLP_08740	Q72RI6	COG3852	Signal transduction histidine kinase NtrB, nitrogen specific
LIC_13121	LMANV2_20041	LIMLP_01850	Q72MS1		hypothetical protein
LIC_20042	LMANV2_90143	LIMLP_18035	Q75FY9	COG0784	CheY-like REC (receiver) domain, includes protein CheY and Spo0F
LA_0935			Q8F7K9	COG0728	Lipid II flippase MurJ/MviN (peptidoglycan biosynthesis)
LA_2256			Q8F3Z3	COG1474	Cdc6-related protein, AAA superfamily ATPase
LIC_11918	LMANV2_290047	LIMLP_09565	Q72R33		Outer membrane lipoprotein-sorting protein
LIC_11497	LMANV2_440013	LIMLP_07290	Q72S87		Class I SAM-dependent methyltransferase
LIC_20139	LMANV2_180037	LIMLP_18550	Q75FP3		Hypothetical protein
LIC_12046			Q72QR6		Uncharacterized protein
LIC_13403	LMANV2_470028	LIMLP_17365	Q72LZ0	COG2604	Uncharacterized conserved protein
LIC_12590	LMANV2_80030	LIMLP_12965	Q72P85		MFS transporter

LA_2196			Q8F451		Uncharacterized protein
LIC_10137	LMANV2_370106	LIMLP_00725	Q72W04	COG1385	16S rRNA U1498 N3-methylase RsmE
LIC_12235	LMANV2_460037	LIMLP_11090	Q72Q77		Response regulator
LIC_10698	LMANV2_170097	LIMLP_14240	Q72UF9	COG1886	Flagellar motor switch/type III secretory pathway protein FliN
LIC_11882	LMANV2_290003	LIMLP_09345	Q72R66	COG1585	Membrane protein implicated in regulation of membrane protease activity
LIC_12069	LMANV2_280011	LIMLP_10235	Q72QP4		Murein biosynthesis integral membrane protein MurJ
LIC_11917	LMANV2_290046	LIMLP_09560	Q72R34		16S rRNA (uracil(1498)-N(3))-methyltransferase
LIC_10052	LMANV2_100063	LIMLP_00275	Q72W85		Hypothetical protein
LIC_10460	LMANV2_30024	LIMLP_15435	Q72V43	COG0177	Endonuclease III
LIC_12734	LMANV2_240014	LIMLP_03800	Q72NU5		Hypothetical protein
LIC_13233	LMANV2_480044	LIMLP_01285	Q72MF4		DUF2889 domain-containing protein
LIC_10543	LMANV2_130054	LIMLP_15025	Q72UW4	COG2802	Uncharacterized conserved protein, LON_N-like domain, ASCH/PUA-
LIC_12588	LMANV2_80028	LIMLP_12955	Q72P87	COG0643	Chemotaxis protein histidine kinase CheA
LIC_12088	LMANV2_650036	LIMLP_10320	Q72QM5	COG4976	Predicted methyltransferase, contains TPR repeat
LIC_11843	LMANV2_340037	LIMLP_09155	Q72RA5		NfeD family protein
LIC_12891	LMANV2_40004	LIMLP_02970	Q72NE3	COG1131	ABC-type multidrug transport system, ATPase component
LIC_10368	LMANV2_230063	LIMLP_15940	Q72VD2	COG1918	Fe ²⁺ transport protein FeoA
LIC_10806	LMANV2_830002	LIMLP_13675	Q72U58		4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase
LIC_13238	LMANV2_480049	LIMLP_01260	Q72MF0		Hypothetical protein
LIC_12271	LMANV2_460001	LIMLP_11280	Q72Q42	COG2063	Flagellar basal body L-ring protein FlgH
LIC_10552	LMANV2_130045	LIMLP_14970	Q72UV5	COG4770	Acetyl/propionyl-CoA carboxylase, alpha subunit
LIC_11797	LMANV2_490073	LIMLP_08915	Q72RE8		Hybrid sensor histidine kinase/response regulator
LIC_13472	LMANV2_470099	LIMLP_17685	Q72LS8	COG4251	hypothetical protein
LA_1059			Q8F789		Uncharacterized protein
LIC_10829			Q72U35	COG2265	tRNA/tmRNA/rRNA uracil-C5-methylase, TrmA/RlmC/RlmD family
LIC_12051			Q72QR1		Uncharacterized protein
LIC_12660	LMANV2_320069	LIMLP_04185	Q72P16	COG1674	DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE or related protein
LIC_11403	LMANV2_150053	LIMLP_06845	Q72SH9		Ferrous iron transport protein A
LA_2660			Q8F2V7	COG3784	Uncharacterized conserved protein YdbL, DUF1318 family

LIC_11211	LMANV2_790008	LIMLP_05910	Q72T11	COG2216	K ⁺ transport ATPase, ATPase subunit KdpB
LIC_13309	LMANV2_330129	LIMLP_16925	Q72M81	COG2175	Taurine dioxygenase, alpha-ketoglutarate-dependent
LIC_11326	LMANV2_150138	LIMLP_06495	Q72SP9		Flagellar L-ring protein FlgH
LIC_10196	LMANV2_370037	LIMLP_01040	Q72VV0	COG4886	Leucine-rich repeat (LRR) protein
LIC_13368	LMANV2_330058	LIMLP_17210	Q72M23	COG4886	Leucine-rich repeat (LRR) protein
LA_3015			Q8F1W3	COG4191	Signal transd histidine kinase regulating C4-dicarboxylate transport system
LA_1080			Q8F768	COG1345	Flagellar capping protein FliD
LIC_12253	LMANV2_460020	LIMLP_11180	Q72Q60		DUF1566 domain-containing protein
LA_0127			Q8F9R4	COG1670	Protein N-acetyltransferase, RimJ/RimL family
LIC_11035	LMANV2_350025	LIMLP_04985	Q72TI6	COG0596	MenH and related esterases, alpha/beta hydrolase fold
LB_177			Q8EXN1	COG5002	2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate
LIC_12632	LMANV2_80082	LIMLP_13170	Q72P44	COG1960	Acyl-CoA dehydrogenase related to the alkylation response protein AidB
LIC_11943	LMANV2_290071	LIMLP_09685	Q72R09	COG3607	Lactoylglutathione lyase-related enz, vicinal oxygen chelate (VOC) family
LIC_12436	LMANV2_500051	LIMLP_12135	Q72PN2	COG4422	Bacteriophage protein gp37
LIC_10043	LMANV2_100072	LIMLP_00230	Q72W94	COG1309	DNA-binding protein, AcrR family, nucleoid occlusion protein SlmA
LIC_12807	LMANV2_240098	LIMLP_03430	Q72NM5		DNA-binding response regulator
LIC_11495	LMANV2_440015	LIMLP_07280	Q72S89		ABC transporter ATP-binding protein
LIC_11085	LMANV2_120036	LIMLP_05245	Q72TD6	COG0621	tRNA A37 methylthiotransferase MiaB
LIC_10071	LMANV2_100040	LIMLP_00385	Q72W66	COG3832	Chalcone/flavanone-binding protein YndB, AHSA1/START/SRPBCC
LIC_11826	LMANV2_340053	LIMLP_09070	Q72RC0	COG0775	Nucleoside phosphorylase/nucleosidase, MtnN and MqnB
LIC_10401	LMANV2_50044	LIMLP_04470	Q72VA0	COG0564	Pseudouridine synthase RluA, 23S rRNA- or tRNA-specific
LIC_12093	LMANV2_650033	LIMLP_10345	Q72QM0	COG2844	UTP:GlnB (protein PII) uridylyltransferase
LIC_10086	LMANV2_100024	LIMLP_00465	Q72W54	COG2265	tRNA/tmRNA/rRNA uracil-C5-methylase, TrmA/RlmC/RlmD family
LIC_11561	LMANV2_590053	LIMLP_07620	Q72S25	COG1231	Monoamine oxidase
LIC_12431	LMANV2_500046	LIMLP_12110	Q72PN7		TetR/AcrR family transcriptional regulator
LIC_11956	LMANV2_290085	LIMLP_09755	Q72QZ6		DUF115 domain-containing protein
LA_1652			Q8F5M1	COG0840	Methyl-accepting chemotaxis protein (MCP)
LIC_10991	LMANV2_530021	LIMLP_04745	Q72TM6	COG0250	Transcription termination/antitermination protein NusG
LIC_13082	LMANV2_560017	LIMLP_02035	Q72MV7	COG1214	tRNA A37 threonylcarbamoyladenosine modification protein TsaB

LIC_20020	LMANV2_90117	LIMLP_17905	Q75FZ5		Chromosome partitioning protein ParA
LIC_12887	LMANV2_240190	LIMLP_02995	Q72NE7		DUF3365 domain-containing protein
LIC_12022	LMANV2_280046	LIMLP_10090	Q72QT7	COG0427	Propionyl CoA:succinate CoA transferase
LIC_12625	LMANV2_80073	LIMLP_13130	Q72P51	COG3814	SspB-like protein, predicted to bind SsrA peptide
LIC_11113	LMANV2_120008	LIMLP_05380	Q72TA8	COG1028	NAD(P)-dependent dehydrogenase, short-chain alcohol dehydrogenase
LIC_10015	LMANV2_100104	LIMLP_00075	Q72WC2	COG0205	6-phosphofructokinase
LIC_10375	LMANV2_230052	LIMLP_15900	Q72VC6	COG2085	Predicted dinucleotide-binding enzyme
LIC_11388	LMANV2_150066	LIMLP_06800	Q72SJ4	COG3063	Type IV pilus assembly protein PilF/PilW
LIC_13131	LMANV2_20030	LIMLP_01795	Q72MR2	COG1192	ParA-like ATPase
LIC_20012	LMANV2_90109	LIMLP_17860	Q75G03	COG1232	Protoporphyrinogen oxidase HemY/PPOX
LIC_20091	LMANV2_90206	LIMLP_18300	Q75FU0	COG5002	Sensor histidine kinase WalK
LIC_12470	LMANV2_520012	LIMLP_12330	Q72PK1		Hypothetical protein
LA_1198			Q8F6V2	COG0265	Periplasmic serine protease, S1-C subfamily, contain C-terminal PDZ domain
LIC_10723	LMANV2_170122	LIMLP_14105	Q72UD4		Flagellar hook protein FliD
LIC_12727	LMANV2_240005	LIMLP_03835	Q72NV2	COG2227	2-polyprenyl-3-methyl-5-hydroxy-6-methoxy-1,4-benzoquinol methylase
LIC_10049	LMANV2_100066	LIMLP_00260	Q72W88	COG1696	D-alanyl-lipoteichoic acid acyltransferase DltB, MBOAT superfamily
LIC_11722	LMANV2_670005	LIMLP_08550	Q72RM3	COG2208	Phosphoserine phosphatase RsbU, regulator of sigma subunit
LIC_13409	LMANV2_470034	LIMLP_17385	Q72LY4		NAD(P)-dependent oxidoreductase
LIC_10347	LMANV2_60131	LIMLP_16030	Q72VF0	COG0283	Cytidylate kinase
LIC_10867	LMANV2_400004	LIMLP_13345	Q72TZ7	COG1024	Enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase
LIC_10553	LMANV2_130044	LIMLP_14965	Q72UV4	COG0308	Aminopeptidase N, contains DUF3458 domain
LIC_12633	LMANV2_80083	LIMLP_13175	Q72P43		Hypothetical protein
LIC_10041	LMANV2_100075	LIMLP_00215	Q72W96		UpX family transcription antiterminator
LIC_10978	LMANV2_530007	LIMLP_04685	Q72TN9		Hypothetical protein
LIC_11537	LMANV2_590028	LIMLP_07500	Q72S49	COG1651	Protein thiol-disulfide isomerase DsbC

Fonte: A autora (2022).

Tabela 3 – Proteínas expressas exclusivamente na presença de TPA

ORF <i>L. interrogans</i>	ORF <i>L. manilae</i>	ORF <i>L. manilae</i>	Código Uniprot	COG	Proteínas de <i>L. interrogans</i> sv. Copenhageni presente exclusivamente no cultivo com TPA e identificadas por MS
TPA ONLY					
LIC_10189	LMANV2_370046	LIMLP_01005	Q72VV7	COG2201	Chemotaxis response regulator CheB
LIC_10833	LMANV2_110003	LIMLP_13520	Q72U31		VOC family protein
LIC_13079	LMANV2_560014	LIMLP_02050	Q72MW0	COG0475	Kef-type K ⁺ transport system, membrane component KefB
LIC_12191	LMANV2_660085	LIMLP_10880	Q72QC1	COG0167	Dihydroorotate dehydrogenase
LIC_12521	LMANV2_200048	LIMLP_12605	Q72PF0	COG0249	DNA mismatch repair ATPase MutS
LIC_13389	LMANV2_470010	LIMLP_17295	Q72M04	COG0444	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system,ATPase comp.
LIC_11695	LMANV2_670036	LIMLP_08415	Q72RP9	COG1360	Flagellar motor protein MotB
LIC_20251	LMANV2_90066	LIMLP_19150	Q75FE3	COG2110	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase (regulator of RNase III)
LIC_12828	LMANV2_240122	LIMLP_03315	Q72NK6	COG0739	Murein DD-endopeptidase MepM and murein hydrolase activator NlpD
LIC_12132	LMANV2_660013	LIMLP_10555	Q72QI1		Hypothetical protein
LIC_12607	LMANV2_80053	LIMLP_13045	Q72P69	COG0745	DNA-binding response regulator, OmpR family
LIC_12752	LMANV2_240038	LIMLP_03705	Q72NS7	COG0666	Ankyrin repeat
LIC_11706	LMANV2_670022	LIMLP_08475	Q72RN9	COG0663	Carbonic anhydrase or acetyltransferase, isoleucine patch superfamily
LIC_13141		LIMLP_01740	Q72MQ2	COG1344	Flagellin and related hook-associated protein FlgL
LIC_11332	LMANV2_150132	LIMLP_06525	Q72SP5	COG3263	NhaP-type Na ⁺ /H ⁺ and K ⁺ /H ⁺ antiporter with C-terminal TrkAC and CorC
LIC_20069	LMANV2_90181	LIMLP_18180	Q75FW2		Mechanosensitive ion channel protein
LIC_12318	LMANV2_620011	LIMLP_11540	Q72PZ7	COG0534	Na ⁺ -driven multidrug efflux pump, DinF/NorM/MATE family
LIC_13113	LMANV2_20049	LIMLP_01880	Q72MS9	COG0452	Phosphopantothenoylcysteine synthetase/decarboxylase CoaBC

LIC_11071	LMANV2_120052	LIMLP_05180	Q72TF0	COG1538	Outer membrane protein TolC
LIC_11185	LMANV2_410009	LIMLP_05740	Q72T36	COG2267	Lysophospholipase, alpha-beta hydrolase superfamily
LIC_13433	LMANV2_470059	LIMLP_17505	Q72LW0	COG1366	Anti-anti-sigma regulatory factor (antagonist of anti-sigma factor)
LIC_13272	LMANV2_330028	LIMLP_16735	Q72MB6	COG1573	Uracil-DNA glycosylase
LIC_10166	LMANV2_370076	LIMLP_00870	Q72VX9	COG1090	NAD dependent epimerase/dehydratase family enzyme
LIC_10474	LMANV2_300013	LIMLP_15345	Q72V29	COG0237	Dephospho-CoA kinase
LIC_12366	LMANV2_210026	LIMLP_11785	Q72PV1	COG2259	Uncharacterized membrane protein YphA, DoxX/SURF4 family
LIC_11501	LMANV2_440009	LIMLP_07310	Q72S83	COG1476	DNA-binding transcriptional regulator, XRE-family HTH domain
LIC_11224	LMANV2_580009	LIMLP_05980	Q72SZ8	COG2259	Uncharacterized membrane protein YphA, DoxX/SURF4 family
LIC_12610	LMANV2_80056	LIMLP_13060	Q72P66	COG1011	FMN and 5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)uracil phosphatase YigB
LIC_13041	LMANV2_390005	LIMLP_02225	Q72MZ8		DoxX family protein
LIC_13187	LMANV2_690016	LIMLP_01525	Q72MK6	COG0463	Glycosyltransferase involved in cell wall bisynthesis
LIC_13384	LMANV2_470005	LIMLP_17270	Q72M09	COG1639	HD-like signal output (HDOD) domain, no enzymatic activity
LIC_12321	LMANV2_620008	LIMLP_11560	Q72PZ4		Thioesterase
LIC_20151	LMANV2_610001	LIMLP_18615	Q75FN1	COG0707	UDP-N-acetylglucosamine:LPS N-acetylglucosamine transferase
LIC_13186	LMANV2_690017	LIMLP_01530	Q72MK7	COG0741	Soluble lytic murein transglycosylase or regulatory protein
LIC_11396	LMANV2_150061	LIMLP_06810	Q72SI6		Hypothetical protein
LIC_11841	LMANV2_340038	LIMLP_09150	Q72RA7	COG0229	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB
LIC_10630	LMANV2_170020	LIMLP_14585	Q72UM7		Host attachment protein
LIC_12710	LMANV2_320015	LIMLP_03925	Q72NW8	COG1007	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit 2 (chain N)
LIC_11927	LMANV2_290057	LIMLP_09610	Q72R24	COG1008	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit 4 (chain M)
LIC_12946	LMANV2_70031	LIMLP_02705	Q72N90		Glycosyltransferase family 2 protein
LA_0979			Q8F7G6		Uncharacterized protein
LIC_12751	LMANV2_240037	LIMLP_03710	Q72NS8		NADH-quinone oxidoreductase subunit M
LIC_11736	LMANV2_490011	LIMLP_08620	Q72RK9	COG5645	Uncharacterized conserved protein YceK
LIC_11824	LMANV2_340055	LIMLP_09060	Q72RC2		ABC transporter ATP-binding protein
LIC_10063	LMANV2_100051	LIMLP_00325	Q72W74		HAMP domain-containing protein
LA_2514			Q8F394		Pantothenate synthetase
LIC_20076	LMANV2_90190	LIMLP_18225	Q75FV5		Class I SAM-dependent methyltransferase

LIC_13100	LMANV2_20062	LIMLP_01940	Q72MU2		TIGR01777 family protein
LIC_13450	LMANV2_470077	LIMLP_17585	Q72MJ4	COG0621	tRNA A37 methylthiotransferase MiaB
LIC_10731	LMANV2_170132	LIMLP_14055	Q72UC8	COG2208	Phosphoserine phosphatase RsbU, regulator of sigma subunit
LIC_12570	LMANV2_80010	LIMLP_12865	Q72PA4	COG1696	D-alanyl-lipoteichoic acid acyltransferase DltB, MBOAT superfamily
LIC_10144	LMANV2_370098	LIMLP_00760	Q72VZ7		RNA polymerase sigma factor
LIC_10199	LMANV2_370034	LIMLP_01055	Q72VU7		Glycosyltransferase family 1 protein
LIC_12653			Q72P23	COG0291	Ribosomal protein L35
LIC_12945	LMANV2_70030	LIMLP_02710	Q72N91		Hypothetical protein
LIC_10139	LMANV2_370103	LIMLP_00735	Q72W02	COG0673	Predicted dehydrogenase
LIC_20109	LMANV2_180002	LIMLP_18400	Q75FS2	COG1696	D-alanyl-lipoteichoic acid acyltransferase DltB, MBOAT superfamily
LIC_11360	LMANV2_150101	LIMLP_06640	Q72SL9	COG0824	Acyl-CoA thioesterase FadM
LIC_10996	LMANV2_530027	LIMLP_04775	Q72TM1	COG5381	Uncharacterized conserved protein
LIC_20210	LMANV2_90014	LIMLP_18930	Q75FH9		Methylmalonyl Co-A mutase-associated GTPase MeaB
LIC_11150	LMANV2_600002	LIMLP_05585	Q72T71	COG1051	ADP-ribose pyrophosphatase YjhB, NUDIX family
LIC_11060	LMANV2_120065	LIMLP_05125	Q72TG1	COG2171	Tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase
LIC_12596	LMANV2_80039	LIMLP_12990	Q72P80	COG1442	Lipopolysaccharide biosynthesis protein, LPS:glycosyltransferase
LIC_11250	LMANV2_160006	LIMLP_06110	Q72SX2	COG0550	DNA topoisomerase IA
LIC_11290	LMANV2_160055	LIMLP_06330	Q72ST4	COG3055	N-acetylneuraminic acid mutarotase
LIC_20145	LMANV2_180043	LIMLP_18580	Q75FN7	COG0735	Fe ²⁺ or Zn ²⁺ uptake regulation protein Fur/Zur
LIC_11940	LMANV2_290068	LIMLP_09670	Q72R12	COG4251	Bacteriophytochrome (light-regulated signal transduction histidine kinase)
LIC_10866	LMANV2_400003	LIMLP_13350	Q72TZ8		PIN domain-containing protein
LIC_11058	LMANV2_120069	LIMLP_05110	Q72TG3	COG0845	Multidrug efflux pump subunit AcrA (membrane-fusion protein)
LIC_11426	LMANV2_150027	LIMLP_06960	Q72SF7	COG5305	Uncharacterized membrane protein PF0508
LIC_10807	LMANV2_830001	LIMLP_13670	Q72U57	COG1807	PMT family glycosyltransferase ArnT/Agl22
LIC_12800	LMANV2_240091	LIMLP_03465	Q72NN2	COG0726	Peptidoglycan/xylan/chitin deacetylase, PgdA/NodB/CDA1 family
LIC_12391	LMANV2_210003	LIMLP_11905	Q72PS6	COG0558	Phosphatidylglycerophosphate synthase
LIC_11922	LMANV2_290051	LIMLP_09585	Q72R29		Hypothetical protein
LIC_10802	LMANV2_260064	LIMLP_13695	Q72U62	COG0444	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase comp.
LA_3451			Q8F0P1	COG1366	Anti-anti-sigma regulatory factor (antagonist of anti-sigma factor)

LIC_10180	LMANV2_370055	LIMLP_00960	Q72VW6	COG3825	Uncharacterized CoxE-like protein, contains von Willebrand factor type A
LIC_10013	LMANV2_100106	LIMLP_00065	Q72WC4	COG1230	Co/Zn/Cd efflux system component
LIC_12174	LMANV2_660064	LIMLP_10775	Q72QD8		Acetyltransferase
LIC_11906	LMANV2_290034	LIMLP_09495	Q72R44		CDP-alcohol phosphatidyltransferase family protein
LIC_10303	LMANV2_60083	LIMLP_16250	Q72VJ4	COG0840	Methyl-accepting chemotaxis protein (MCP)
LIC_11520	LMANV2_590011	LIMLP_07420	P62643	COG0628	Predicted PurR-regulated permease PerM
LA_1667			Q8F5L4	COG1063	Threonine dehydrogenase or related Zn-dependent dehydrogenase
LIC_12784	LMANV2_240071	LIMLP_03540	Q72NP8		Cys-rich protein
LIC_10528	LMANV2_300069	LIMLP_15095	Q72UX9	COG3766	Uncharacterized membrane protein YjfL, UPF0719 family
LIC_11059	LMANV2_120068	LIMLP_05115	Q72TG2	COG2208	Phosphoserine phosphatase RsbU, regulator of sigma subunit
LIC_10400			Q72VA1	COG0739	Murein DD-endopeptidase MepM and murein hydrolase activator NlpD
LIC_13236	LMANV2_480046	LIMLP_01270	Q72MF2		Ankyrin repeat domain-containing protein
LA_2503			Q8F3A4	COG1377	Flagellar biosynthesis protein FlhB
LIC_13085	LMANV2_560022	LIMLP_02020	Q72MV4		Dephospho-CoA kinase
LIC_10579	LMANV2_130018	LIMLP_14850	Q72US8	COG2232	Pyrrolysine biosynthesis ligase PylC and related enzymes, ATP-grasp
LIC_12471	LMANV2_520010	LIMLP_12335	Q72PK0	COG2733	Uncharacterized membrane-anchored protein YjiN, DUF445 family
LIC_11288	LMANV2_160051	LIMLP_06315	Q72ST6		Hypothetical protein
LIC_12833	LMANV2_240127	LIMLP_03290	Q72NK1		Arabinose kinase
LIC_20018	LMANV2_90115	LIMLP_17890	Q75FZ7		Ferrochelataase
LIC_13169	LMANV2_450009	LIMLP_01615	Q72MM4	COG1749	Flagellar hook protein FlgE
LIC_10919	LMANV2_720018	LIMLP_04385	Q72TU7		Hypothetical protein
LA_2290			Q8F3V9	COG4886	Leucine-rich repeat (LRR) protein
LIC_12903	LMANV2_40016	LIMLP_02920	Q72ND1	COG0560	Phosphoserine phosphatase
LIC_11180	LMANV2_410015	LIMLP_05715	Q72T41	COG0038	H ⁺ /Cl ⁻ antiporter ClcA
LIC_12080	LMANV2_650042	LIMLP_10290	Q72QN3	COG2385	Peptidoglycan hydrolase (amidase) enhancer domain SpoIID
LIC_11592	LMANV2_140012	LIMLP_07760	Q72RZ6		AI-2E family transporter
LIC_13283	LMANV2_330013	LIMLP_16795	Q72MA5		Peptidase M23
LIC_12491	LMANV2_200012	LIMLP_12435	Q72PI0	COG1808	Uncharacterized membrane protein AF0785, contains DUF389 domain
LIC_11801	LMANV2_340079	LIMLP_08940	Q72RE4		Anti-sigma factor antagonist

LIC_10159	LMANV2_370085	LIMLP_00830	Q72VY6	COG1704	Magnetosome formation protein MamQ, lipoprotein antigen LemA family
LIC_11691	LMANV2_670039	LIMLP_08395	Q72RQ3	COG2200	EAL domain, c-di-GMP-specific phosphodiesterase class I
LIC_20027	LMANV2_90127	LIMLP_17950	Q75G17		Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase
LIC_12649	LMANV2_320081	LIMLP_04235	Q72P27	COG5573	Predicted nucleic acid-binding protein, contains PIN domain
LIC_12031	LMANV2_280034	LIMLP_10140	Q72QS8	COG3865	Glyoxalase superfamily enzyme
LIC_12611	LMANV2_80057	LIMLP_13065	Q72P65	COG0625	Glutathione S-transferase
LIC_11586			Q72S01	COG3173	Predicted kinase, aminoglycoside phosphotransferase (APT) family
LIC_10285	LMANV2_60060	LIMLP_16360	Q72VL2	COG1680	CubicO group peptidase, beta-lactamase class C family
LIC_12669	LMANV2_320063	LIMLP_04155	Q72P08	COG5622	Protein required for attachment to host cells
LIC_10083	LMANV2_100025	LIMLP_00450	Q72W55	COG0745	DNA-binding response regulator, OmpR family, contains REC and wHTH
LIC_12415	LMANV2_500028	LIMLP_12025	Q72PQ3	COG0768	Cell division protein FtsI, peptidoglycan transpeptidase
LIC_13103	LMANV2_20059	LIMLP_01925	Q72MT9	COG4804	Predicted nuclease of restriction endonuclease-like RecB. DUF1016 family
LIC_11077	LMANV2_120045	LIMLP_05210	Q72TE4		Hypothetical protein
LIC_12034	LMANV2_280031	LIMLP_10155	Q72QS5		Transcriptional repressor
LIC_10136	LMANV2_370107	LIMLP_00720	Q72W05		ABC transporter ATP-binding protein
LA_4184			Q8EYM9		Uncharacterized protein
LIC_10362	LMANV2_60147	LIMLP_15955	Q72VD6	COG1835	Peptidoglycan/LPS O-acetylase OafA/YrhL,
LIC_10505			Q72UZ8	COG0122	3-methyladenine DNA glycosylase/8-oxoguanine DNA glycosylase
LIC_12965	LMANV2_70053	LIMLP_02610	Q72N72		Hypothetical protein
LIC_12462	LMANV2_500080	LIMLP_12280	Q72PK9	COG0739	Murein DD-endopeptidase MepM and murein hydrolase activator NlpD
LIC_13339	LMANV2_330094	LIMLP_17070	Q72M52	COG0438	Glycosyltransferase involved in cell wall biosynthesis
LIC_12050			Q72QR2		Uncharacterized protein
LIC_11124	LMANV2_360020	LIMLP_05445	Q72T97		Chloride channel protein
LIC_11714	LMANV2_670012	LIMLP_08515	Q72RN1		Cation transporter
LIC_13218	LMANV2_480028	LIMLP_01355	Q72MG9	COG0486	tRNA U34 5-carboxymethylaminomethyl modifying GTPase MnmE/TrmE
LIC_12492	LMANV2_200013	LIMLP_12440	Q72PH9	COG1595	DNA-directed RNA polymerase specialized sigma subunit, sigma24 family
LIC_13295		LIMLP_16855	Q72M93	COG2206	HD-GYP domain, c-di-GMP phosphodiesterase class II
LIC_20207	LMANV2_90011	LIMLP_18915	Q75FI2	COG1132	ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease component
LIC_12613	LMANV2_80059	LIMLP_13075	Q72P63		Hypothetical protein

LIC_20079	LMANV2_90194	LIMLP_18240	Q75FV2	COG2208	Phosphoserine phosphatase RsbU, regulator of sigma subunit
LIC_13461	LMANV2_470087	LIMLP_17635	Q72LT8	COG2204	DNA-binding transcriptional response regulator, NtrC family
LIC_11375	LMANV2_150086	LIMLP_06710	Q72SK6		Flagellar type III secretion system protein FlhB
LIC_10012	LMANV2_100107	LIMLP_00060	Q72WC5	COG2269	Elongation factor P--beta-lysine ligase (EF-P beta-lysylation pathway)
LIC_11910	LMANV2_290037	LIMLP_09515	Q72R41		Polysaccharide deacetylase family protein
LIC_10228	LMANV2_370003	LIMLP_01195	Q72VR8	COG1703	GTPase of the G3E family (not a periplasmic protein kinase)
LA_1758			Q8F5C5	COG0861	Tellurite resistance membrane protein TerC
LIC_13102	LMANV2_20060	LIMLP_01930	Q72MU0	COG4771	Outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins
LIC_10224	LMANV2_370007	LIMLP_01175	Q72VS2		M23 family metallopeptidase
LIC_10238	LMANV2_60017	LIMLP_16560	Q72VQ8		DNA-3-methyladenine glycosylase 2 family protein
LIC_13047		LIMLP_02195	Q72MZ2	COG0647	Ribonucleotide monophosphatase NagD, HAD superfamily
LIC_11399	LMANV2_150057	LIMLP_06825	Q72SI3	COG2226	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methylase UbiE/MenG
LIC_20016	LMANV2_90113	LIMLP_17880	Q75FZ9	COG0668	Small-conductance mechanosensitive channel
LIC_13444	LMANV2_470071	LIMLP_17560	Q72LU9	COG0276	Protoheme ferro-lyase (ferrochelataze)
LIC_20212	LMANV2_90017	LIMLP_18945	Q75FH7		Hypothetical protein
LIC_13269	LMANV2_330031	LIMLP_16720	Q72MB9	COG0394	Protein-tyrosine-phosphatase
LIC_12824	LMANV2_240118	LIMLP_03335	Q72NL0		Hypothetical protein
LIC_12004			Q72QV4	COG2208	Phosphoserine phosphatase RsbU, regulator of sigma subunit
LIC_13135	LMANV2_20026	LIMLP_01775	Q72MQ8	COG0414	Panθοthenate synthetase
LIC_11082	LMANV2_120039	LIMLP_05235	Q72TD9		SpoIID/LytB domain-containing protein
LIC_13027	LMANV2_220044	LIMLP_02310	Q72N11	COG1696	D-alanyl-lipoteichoic acid acyltransferase DltB, MBOAT superfamily
LIC_11188	LMANV2_410005	LIMLP_05755	Q72T33		Flagellar hook protein FlgE
LIC_12227			Q72Q85	COG1055	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NhaD or related arsenite permease
LIC_11565	LMANV2_590058	LIMLP_07640	Q72S22		Hypothetical protein

Fonte: A autora (2022).

A partir da interação de *L. interrogans* com o íon zinco ou o quelante TPA, foram constatadas diversas alterações na regulação do perfil proteico. No geral, os dados proteômicos indicaram mudanças dinâmicas que refletem a plasticidade de proteínas com níveis alterados da bactéria. A seguir, discutimos as implicações dessas mudanças.

5.3 ANÁLISE DE CATEGORIAS FUNCIONAIS

Proteínas cuja expressão foi regulada positiva ou negativamente em resposta ao estresse foram agrupadas de acordo com sua função putativa dentro das categorias funcionais COG (*clusters of orthologous groups*). Para essa análise foram consideradas as proteínas que apresentaram razão de abundância entre as condições (TPA/ZINCO) maior que 1,5 e menor que 0,75, respectivamente.

A fim de compreender e obter descrições de funções de proteínas de *L. interrogans*, realizamos a busca de COG e 80,6% das proteínas detectadas por espectrometria de massas por esse trabalho tinham funções atribuídas no banco de dados COG. Por outro lado, podemos notar que nem todos os COGs foram incluídos em nossa análise, por não apresentarem nenhuma proteína pertencente. Dentre eles as categorias: COG-A (Processamento e modificação de RNA), COG-B (Estrutura e dinâmica da cromatina) e COG-Y (Estrutura nuclear). Já nas proteínas apenas presentes no cultivo com TPA, não foi possível identificar nenhuma proteína presente aos COGs: COG-D (Controle do ciclo celular, divisão celular, partição cromossômica), COG-Q (Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários), COG-U (Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular), COG-X (Mobiloma: profagos, transposons) e COG-W (Estruturas extracelulares). Além dos COGs COG-A (Processamento e modificação de RNA), COG-B (Estrutura e dinâmica da cromatina), COG-Y (Estrutura nuclear), COG-Z (Citoesqueleto) que também foram observados nas proteínas exclusivamente expressas na presença de zinco.

A Figura 5 apresenta uma visão geral do número de proteínas pertencentes a grupos selecionados de grupos ortólogos (COGs) nos quais os agrupamentos variam com as diferentes condições experimentais em relação ao número total de proteínas descritas em cada COG. Como pode ser observado na figura 5, o número de proteínas com níveis aumentados (indicados como positivos no eixo Y em azul) ou níveis diminuídos (indicados como negativos no eixo Y em vermelho) e na figura 6 o número de proteínas identificadas exclusivamente no cultivo com zinco (indicados como positivos no eixo Y em azul) e TPA (indicados como negativos no eixo Y em vermelho).

Figura 5 – Visão geral da distribuição das proteínas diferencialmente expressas de acordo com a categorização do COG.



No Eixo Y temos o número de proteínas e no eixo X as categorias COG. As barras se referem ao número de proteínas com níveis aumentados (indicados como positivos no eixo Y em azul) ou níveis diminuídos (indicados como negativos no eixo Y em vermelho) a partir da comparação entre as condições de cultivo TPA/zinco. As categorias COG representadas foram: (C) Produção e conversão de energia; (D) Controle do ciclo celular, divisão celular, partição cromossômica; (E) Transporte e metabolismo de aminoácidos; (F) Transporte e metabolismo de nucleotídeos; (G) Transporte e metabolismo de carboidratos; (H) Transporte e metabolismo de coenzimas; (I) Transporte e metabolismo lipídico; (J) Tradução, estrutura e biogênese ribossomal; (K) Transcrição; (L) Replicação, recombinação e reparo; (M) Biossíntese de parede/membrana/envelope celular; (N) Motilidade celular; (O) Modificação pós-traducional, reciclagem de proteínas, chaperonas; (P) Transporte e metabolismo de íons inorgânicos; (Q) Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários; (R) Apenas previsão de função geral; (S) Função desconhecida; (T) Mecanismos de transdução de sinal; (U) Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular; (V) Mecanismos de defesa; (W) Estruturas extracelulares; (X) Mobiloma: profagos, transposons; (Z) Citoesqueleto.

Fonte: A autora (2022)

Figura 6: Distribuição das proteínas diferencialmente expressas na cultivo exclusivo com TPA ou Zinco de acordo com a categorização do COG

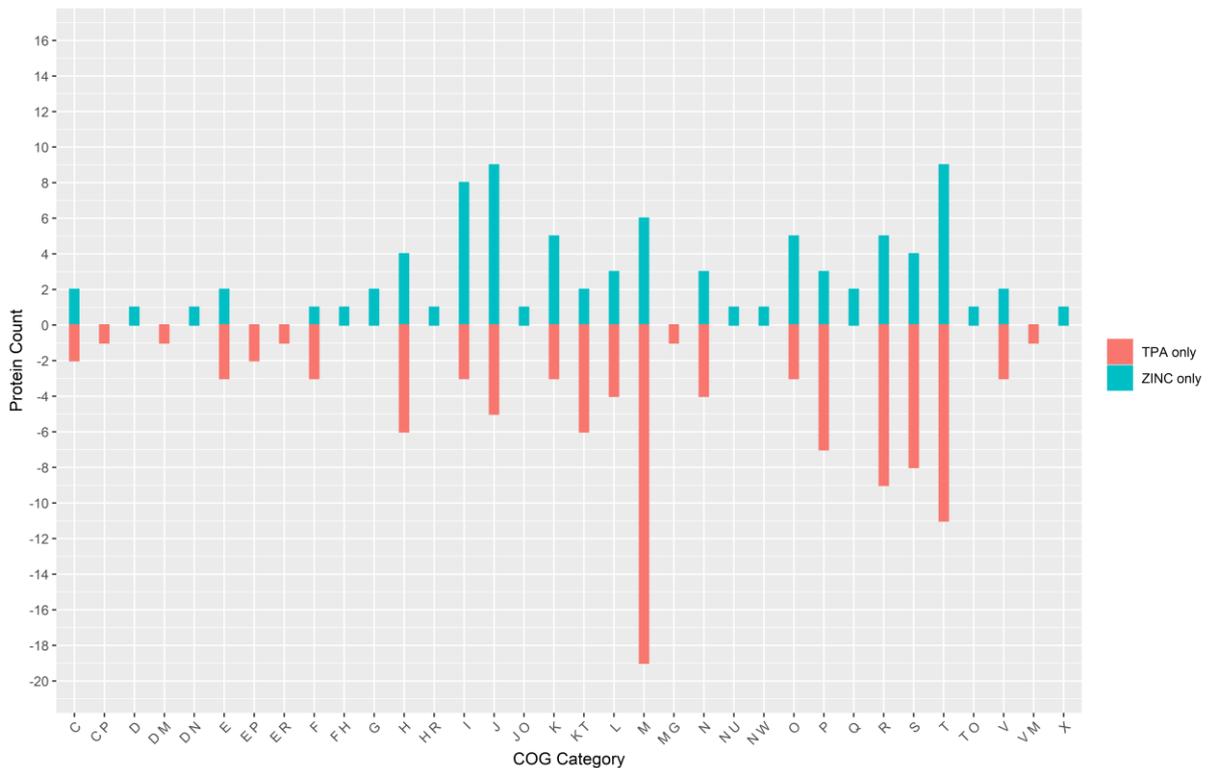
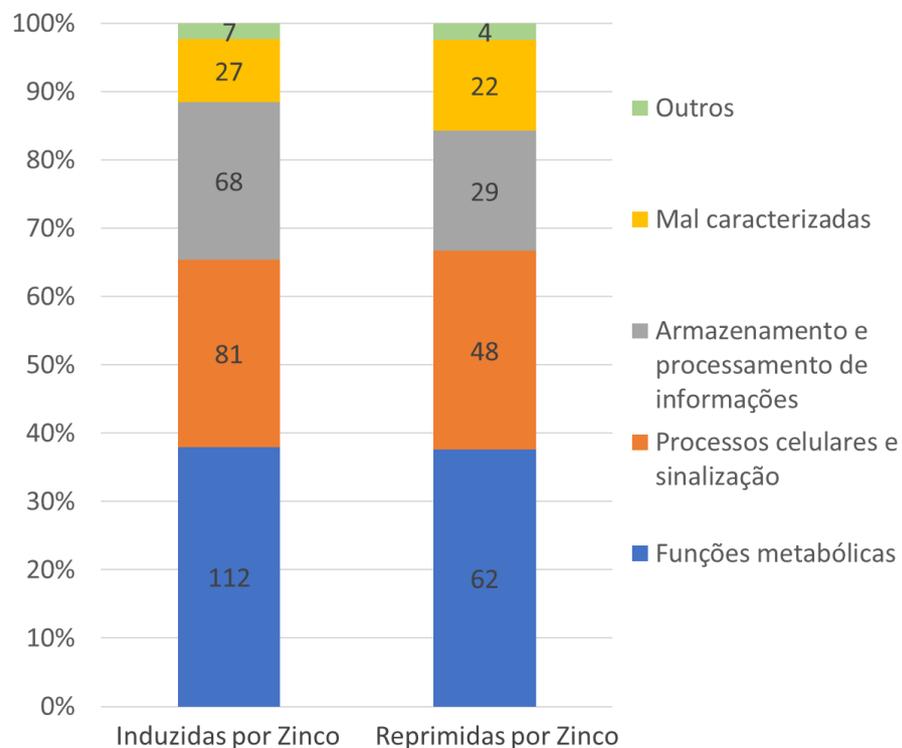


Figura 6: Distribuição das proteínas diferencialmente expressas de acordo com a categorização do COG. No Eixo Y temos o número de proteínas e no eixo X as categorias COG. As barras se referem ao número de proteínas, indicados como exclusivo de zinco no eixo Y em azul e indicados como exclusivo de TPA no eixo Y em vermelho. As categorias COG representadas foram: (C) Produção e conversão de energia; (D) Controle do ciclo celular, divisão celular, partição cromossômica; (E) Transporte e metabolismo de aminoácidos; (F) Transporte e metabolismo de nucleotídeos; (G) Transporte e metabolismo de carboidratos; (H) Transporte e metabolismo de coenzimas; (I) Transporte e metabolismo lipídico; (J) Tradução, estrutura ribossomal e biogênese; (K) Transcrição; (L) Replicação, recombinação e reparo; (M) Biossíntese de parede/membrana/envelope celular; (N) Motilidade celular; (O) Modificação pós-traducional, reciclagem de proteínas, chaperonas; (P) Transporte e metabolismo de íons inorgânicos; (Q) Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários; (R) Apenas previsão de função geral; (S) Função desconhecida; (T) Mecanismos de transdução de sinal; (U) Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular; (V) Mecanismos de defesa; (W) Estruturas extracelulares; (X) Mobiloma: profagos, transposons; (Z) Citoesqueleto.

Fonte: A autora (2022)

Para melhor visualização dos dados e discussão, as proteínas foram reorganizadas em subcategorias contendo diferentes ortólogos a partir do resultado da análise COG. Sendo essas subcategorias: (i) funções metabólicas (F, C, H, G, P, E, I, Q), (ii) armazenamento e processamento de informações (J, K, L), (iii) processos celulares e sinalização (V, N, T, U, M, O, D); e (iv) mal caracterizadas (R e S). Vale ressaltar que a maioria das proteínas foi classificada em grupos de “funções metabólicas” (37,8%), “processos celulares e sinalização” (28,04%), “armazenamento e processamento de informações” (21,08%) e por fim “mal caracterizadas” (10,65%) como pode ser observado na figura 7.

Figura 7 - Distribuição das subcategorias de COG utilizadas no trabalho

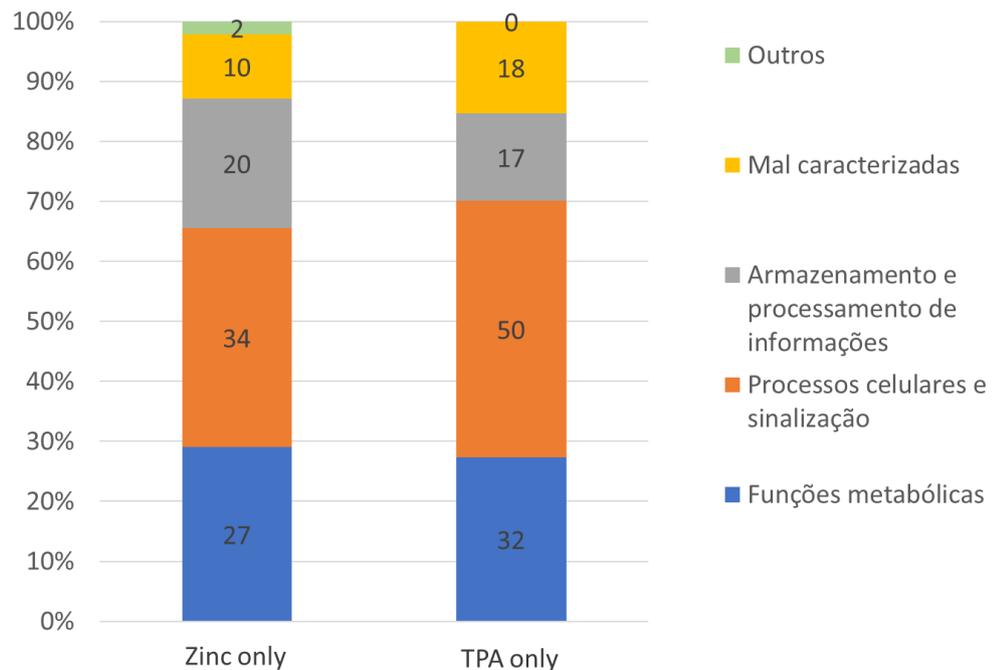


As barras presentes no eixo X representam o valor total de proteínas identificadas nas condições experimentais: Induzidas por zinco e reprimidas por zinco. No eixo Y temos a abundância relativa de subcategorias de COG em porcentagem. Cada subcategorias corresponde a uma cor distinta, sendo elas: Azul - funções metabólicas (F, C, H, G, P, E, I, Q), Cinza - Armazenamento e processamento de informações (J, K, L), Laranja - processos celulares e sinalização (V, N, T, U, M, O, D); Amarelo - mal caracterizados (R e S) e Verde – Outros. Em cada fração o número de total de proteínas/subclasse está representado.

Fonte: A autora (2022).

Em outro momento, quando se referindo as proteínas identificadas como presentes apenas em uma cada condições de cultivo, sendo denominadas TPA/ZINC Only, os resultados seguiram proporções similares como podemos observar na figura 8. Em TPA Only, a maioria das proteínas identificadas é pertencente a subclasse de “Processos celulares e sinalização” (42,7%), seguido por “Funções metabólicas” (27,3%), “Mal caracterizadas” (15,3%) e “Armazenamento e processamento de informações” (14,5%). As taxas de proteínas presentes exclusivamente no cultivo com zinco foram “Processos celulares e sinalização” (36,5%), “Funções metabólicas” (29%), “Mal caracterizadas” (10,75%) e “Armazenamento e processamento de informações” (21,5%) e “Outros” (2,15%).

Figura 8 - Distribuição das subcategorias de COG utilizadas no trabalho



As barras presentes no eixo X representam o valor total de proteínas identificadas nas condições experimentais: Exclusivas em zinco e exclusivas em TPA. No eixo Y temos a abundância relativa de subcategorias de COG em porcentagem. Cada subcategorias corresponde a uma cor distinta, sendo elas: Azul - funções metabólicas (F, C, H, G, P, E, I, Q), Cinza - Armazenamento e processamento de informações (J, K, L), Laranja - processos celulares e sinalização (V, N, T, U, M, O, D); Amarelo - mal caracterizados (R e S) e Verde – Outros. Em cada fração o número de total de proteínas/subclasse está representado.

Fonte: A autora (2022).

Para iniciar a discussão sobre os agrupamentos dessas proteínas apresentaremos uma análise sobre as características gerais das classes proteínas identificadas por meio de nossas análises proteômicas. As proteínas são discutidas no contexto da patogênese da leptospira dentro das categorias funcionais selecionadas.

Buscando caracterizar refinadamente estas proteínas, realizamos a pesquisa individual dos genes codificantes no banco de dados DBBM (<http://www.dbbm.fiocruz.br/leptospira/info/seq/genelist-aLL.htm>). Estes dados estão disponíveis para consulta em anexo ao final dessa dissertação.

5.3.1 Metabolismo

O papel de zinco como fator estrutural e catalítico de enzimas está intensamente associado com o metabolismo de carboidratos, metabolismo de ácidos nucleicos e na síntese de diversas proteínas. Com objetivo de infectar e proliferar no hospedeiro, os patógenos bacterianos necessitam ajustar seu metabolismo para assim se adaptar as diferentes disponibilidades de nutrientes. Dessa forma, já era esperado que proteínas relacionadas com o metabolismo se encontrassem diferencialmente expressas em nosso trabalho.

Em resumo, a alteração de processos celulares e metabólicos por razão da limitação de zinco, pode estar relacionado a respostas intrínsecas a um ambiente deficiente em nutrientes. Nossos resultados indicam que 37,8% das proteínas expressas de forma diferencial estão relacionadas com o metabolismo bacteriano. Sendo dessas, 112 proteínas induzidas por zinco e 62 reprimidas. Como mencionado acima, as alterações da disponibilidade de zinco afetam o metabolismo de carbono (1-C) que integra a maquinaria de tradução e outros. Por intermédio de uma estreita relação entre o metabolismo de 1-C e o íon bivalente de zinco.

Relatos anteriores nos mostram que em patógenos como *Streptococcus pyogenes* a toxicidade do zinco diminui a capacidade do patógeno usar glicose como fonte de carbono, danifica fortemente o metabolismo da glicose através da inibição de duas enzimas glicolíticas: A fosfofrutoquinase e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Sendo assim, o patógeno desenvolveu um mecanismo de mudança metabólica para a via tagatose-6-fosfato permitindo a conversão de D-galactose em diidroxiacetona fosfato e gliceraldeído fosfato, para contornar os danos causados pelo metal e manter a geração de piruvato. Visto isso, os autores apontam que o zinco pode atuar como um sinal regulador do metabolismo do carbono e a outros fatores de virulência em *Streptococcus pyogenes* (ONG; WALKER; MCEWAN, 2015).

Além disso, outras enzimas de ligação ao Zn relacionadas ao metabolismo central de carbono, como frutose 1,6-bifosfato aldolase, triose fosfato isomerase e enolase, desempenham papel relacionados à adesão do microrganismo às células hospedeiras e disseminação tecidual (TRISTÃO et al., 2014).

O zinco é um cofator catalítico e estrutural de dezenas de enzimas, dentre elas a primeira enzima na via de biossíntese do tetraidrofolato (THF), a GTP ciclohidrolase I (GCYH-I). O THF é obtido a partir da redução do ácido fólico, sendo substrato para a síntese de metionina e nucleotídeos. Dessa forma, a ausência de zinco impacta diretamente nos níveis de THF gerando um distúrbio na atividade e na maquinaria de tradução da célula (CHENG-GUANG; GUALERZI, 2021). Além disso, os ribossomos desempenham papel essencial manutenção da homeostase de zinco, sendo discutido de forma mais aprofundada na próxima sessão. Para a montagem do aparato traducional e síntese proteica, as bactérias utilizam de alto custo energético. Sendo assim, a tradução é refinadamente controlada em situações de privação nutricional, dependendo do metabolismo de 1-C, evitando assim, gasto energético desnecessário (DANCHIN; SEKOWSKA; YOU, 2020).

Nossos dados também apontam que a enzima bifuncional FOLD (COG0190 H-Transporte e metabolismo de coenzimas) presente na via de biossíntese do folato esta induzida na presença de zinco. É conhecido que a privação de zinco resulta em falha da via biossintética do folato devido à perda da atividade de FolE dependente de zinco, resultando em uma auxotrofia transitória de purina. Por consequência, a falha na biossíntese de purinas se torna uma das principais decorrências da limitação do folato, pois o cofator derivado de folato, tetraidrofolato (THF), é essencial nas reações de transferência de carbono (CHO- N^{10} -H₄F) na síntese de purinas. Sendo assim, a inibição da biossíntese de THF durante a carência de zinco pode resultar em danos como à morte celular pela auxotrofia de purina e deficiência de timina (CHANDRANGSU et al., 2019; SANKARAN et al., 2009).

Dessa forma, essa análise nos leva a reforçar outra intercessão entre o metabolismo do carbono e a homeostase do zinco devido ao fato de 1-C na forma de CHO- N^{10} -H₄F ser essencial para a biossíntese de purina *de novo*, e para enzimas zinco-dependentes. Com baixas concentrações de CHO- N^{10} -H₄F celular, o seu intermediário 5'-fosforribosil-4-carboxiamida-5-aminoimidazol (AICAR), induzido por zinco em nosso trabalho, começa a se acumular no organismo. Em *B. subtilis*, é descrito que esse acúmulo desencadeia uma sequência de eventos regulados pelo fator de transcrição Zur. Dentre eles, a ativação da metalochaperona ZagA (YciC) para redirecionamento de zinco a FolE, visando restaurar a síntese de folato

(CHANDRANGSU et al., 2019; DANCHIN; SEKOWSKA; YOU, 2020). *Mycolicibacterium smegmatis* também regula diferencialmente diversos genes envolvidos no metabolismo central do carbono em situação de limitação de Zn (DOW et al., 2022).

Seguramente, a biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos em bactérias é de suma importância durante a infecção devido ao fato de purinas e alguns aminoácidos serem escassos *in vivo*. Os autores investigaram genes necessários para o crescimento de *Escherichia coli* em soro humano, concluindo que dentre os mutantes gerados, os com deleção para genes como *GuaB*, *PurE*, *PurC*, *PurN*, *PurL*, *PurH* apresentam defeito de crescimento. Vale ressaltar que os produtos proteicos referentes aos genes citados acima estão presentes em nossos resultados como induzidos por zinco e categorizados no COG-F- Transporte e metabolismo de nucleotídeos. Sendo assim, podemos sugerir que dentre as funções metabólicas essenciais para o crescimento de microrganismos no soro humano, devida a baixa concentração de precursores de ácidos nucléicos nessa matriz, a biossíntese de nucleotídeos se destaca como uma das principais limitações (SAMANT et al., 2008)

Esses resultados indicam que esses grupos de proteínas específicas atuantes em diversas vias do metabolismo celular podem ser uma fonte de informações úteis sobre a resposta da bactéria frente a privação de zinco. Confirmando que a relação entre o metabolismo do carbono (1-C), a tradução e a homeostase do zinco supostamente são vistas nos três domínios da vida (DANCHIN; SEKOWSKA; YOU, 2020).

Duas proteínas exclusivas da condição TPA foram relacionadas com o mesmo COG (0444), sendo elas: Q72M04 e Q72U62. Além de se encaixarem na subclasse “Funções metabólicas”, este COG foi atribuído a duas classes, COG-E (Transporte e metabolismo de aminoácidos) e COG-P (Transporte e metabolismo de íons inorgânicos). As proteínas são descritas como membros do Sistema de transporte de dipeptídeo/oligopeptídeo/transporte de níquel tipo ABC, componente ATPase. Sabe-se que essas proteínas são integrais de membrana e pertencentes à família das permeases do sistema de transporte dependente de proteínas de ligação. Sabe-se que as bactérias são munidas de estratégias para adquirir nutrientes necessários para o seu metabolismo, modulando as mesmas em situações de estresse como a imunidade nutricional. Dentre as manobras essenciais, está a absorção de nutrientes por transportadores de aminoácidos. Há relato na literatura que mostra que a perda de proteínas de ligação ao substrato dos transportadores ABC de captação de aminoácidos atenua a infecção causada pelo patógeno *Moraxella catarrhalis* (MURPHY et al., 2016).

O importador de zinco ZnuABC (ABC do tipo I), está presente em diversos microrganismos, como: *B. abortus*, *S. Typhimurium*, *C. jejuni*, *M. catarrhalis*, *E. coli* uropatogênica, *A. baumannii*, *Y. pestis*, *P. mirabilis*. Sendo um sistema bem descrito e importante para a aquisição do metal, homeostase e patogênese desses agentes (CAPDEVILA; WANG; GIEDROC, 2016). Além da aquisição de metais, os transportadores do tipo ABC também estão fortemente relacionados com a captação de peptídeos e aminoácidos. A captação de nutrientes é essencial para a execução de funções celulares como quimiotaxia, conjugação e esporulação (TANAKA et al., 2018). Dessa forma, podemos inferir que a carência pronunciada do metal na condição de crescimento suplementada com o quelante de zinco, TPA, induz a expressão de proteínas relacionadas com a aquisição de nutrientes essenciais para a interação patógeno/hospedeiro.

Outra proteína presente como expressa exclusivamente no cultivo com TPA e no COG-P “Transporte e metabolismo de íons inorgânicos” é a proteína Q75FN7 (COG0735) descrita como Proteína reguladora da captação de Fe^{2+} ou Zn^{2+} Fur/Zur. Para uma infecção bem sucedida, o patógeno necessita de sofisticadas estratégias para contornar a privação de metais e também o excesso de íons metálicos (MAKTHAL; KUMARASWAMI, 2017). O sistema de captação Zur, é responsável pela regulação transcricional de genes responsáveis pela sobrevivência do agente infeccioso nas situações comentadas anteriormente, a partir de proteínas sensores de metal. Dessa forma, quando ocorre uma depleção severa de zinco intracelular, Zur perde a afinidade ao DNA, permitindo assim o acesso à região promotora de genes codificantes para sistema(s) de absorção de Zn de alta afinidade pela RNA polimerase. (ANDREINI et al., 2006; BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000; CAPDEVILA; WANG; GIEDROC, 2016).

5.3.2 Armazenamento e processamento de informações

Como esperado, as proteínas relacionadas à maquinaria de Tradução (COG-J), Transcrição (COG-K) e replicação e reparo (COG-L) foram abundantes (21% em média), em virtude da utilização estrutural do zinco por fatores de transcrição ao se ligarem ao DNA.

Em COG-J (tradução estrutura de ribossomos e biogênese), a maior presença de proteínas (38/352) foi induzida por zinco. Dentre elas, a maioria é composta por proteínas ribossomais presentes tanto na subunidade ribossomal pequena (S3, S9, S10, S12, S13, S19,) quanto na subunidade grande (L6P, L7, L9, L10, L12, L17, L18, L19, L20, L22, L24, L25, L31). Essas proteínas são essenciais para a sobrevivência da célula, porém a biogênese do

ribossomo e seus componentes gera um gasto energético alto para o microrganismo além de consumir recursos material, dessa forma, é altamente controlado em bactérias. As proteínas ribossomais (PRs) estão presentes em todos os domínios da vida sendo consideradas os principais genes de manutenção com forte regulação da expressão das proteínas, uma vez que interferências na síntese e montagem do ribossomo estão relacionadas com a morte celular. Além disso, as PRs já foram descritas por apresentarem funções extras ribossômicas principalmente durante condições de estresse. Esse motivo é dado pelo acúmulo de PRs devido ao aumento de proteínas ribossomais livres que interagem com outras proteínas celulares. Dentre as diferentes condições capazes de induzir estresses nas PRs, discutiremos a privação do nutriente zinco (CHENG-GUANG; GUALERZI, 2021; KUMAR; KUMAR, 2021).

Estudos relacionando PRs e zinco já foram realizados em organismos como *Bacillus subtilis* e *Streptomyces coelicolor*. Confirmando que essas bactérias estocam zinco nos ribossomos sob condições de abundância do metal e são aptas para liberar o nutriente durante a deficiência de zinco. A liberação do zinco intracelular é possivelmente, realizada para uso por outras metaloproteínas de zinco. Melhorando assim a sobrevivência do organismo durante a privação de zinco (HENSLEY; TIERNEY; CROWDER, 2011).

Esse fato é corroborado por estudos em *B. subtilis* onde proteínas ribossomais alternativas independentes de zinco (AltRPs) L31-2 quando ligada a superfície libera de forma direta Zn^{2+} presente nos ribossomos deslocando L31-1 não essencial que contém Zn^{2+} em sua superfície. Essa é uma estratégia de mobilização do metal intracelular em situação de carência de zinco (AKANUMA et al., 2006). Apesar de não existir evidências de que AltRPs micobacterianos apresentem funções equivalentes às encontradas em *B. subtilis*, os autores demonstraram que AltRPs são fundamentais para a sobrevivência de *M. smegmatis* em condições extremamente escassas de Zn^{2+} . Já que o mutante por deleção do operon ($\Delta altRP$) quando cultivado em meio contendo um quelante de zinco de alta afinidade (TPEN) não apresenta crescimento, enquanto a cepa do tipo selvagem não é impactada nas mesmas condições de crescimento (DOW; PRISIC, 2018).

Esses resultados revelam uma interação regulatória entre a expressão de PRs e as respostas à privação de zinco. Como por exemplo, ao crescer em meio depletado de zinco, *S. coelicolor* apresentou aumento da transcrição de genes de proteínas parálogas a PRs. Sugerindo que um regulador responsivo ao zinco é responsável por sua expressão (OWEN et al., 2007). Dessa forma a repressão de zinco interfere na expressão de genes que codificam uma variedade de parálogos de proteínas ribossomais. Isto se dá ao fato de as cópias originais de todas essas

proteínas apresentarem motivos de fita de Zn previstos, estando assim provavelmente ligadas ao metal. Por outro lado, esses motivos não estão presentes nos parálogos regulados por zinco. Indicando que esses genes atuam de forma a propiciar vantagem seletiva em condições limitadas de zinco, provavelmente pela redução geral da demanda celular do metal (MIKHAYLINA et al., 2018; PANINA; MIRONOV; GELFAND, 2003). Por conseguinte, mesmo com o esgotamento de zinco a tradução se permanece ativa o maior período admissível.

Outra bactéria com potencial dinâmico para remodelação de seus ribossomos em situações de carência de zinco é o organismo *M. smegmatis*. Em estudo utilizando condições opostas de crescimento (1 mM de ZnSO₄ vs. TPEN) pode-se observar que o patógeno com objetivo de liberar o metal para processos metabólicos, substituindo as proteínas ribossomais de ligação ao zinco por parálogos livres de zinco. Como resultado, os autores sugerem que a hibernação dos ribossomos ocorre durante as infecções por *M. smegmatis* (LI et al., 2018). Outro relato contrapõe que a hibernação de ribossomos sugerida por Li e colaboradores como causada não pela depleção de zinco está provavelmente associada ao estresse e à fase estacionária geral (TOBIASSON et al., 2019).

Na espiroqueta *Leptospira interrogans* os genes de proteínas ribossomais estão organizados em um provável operon de 17,5 kb (32 genes, de *fus* a *rplQ*). Este *cluster* mostrou similaridade com o operon da proteína ribossômica S10, *spc* e α de *Escherichia coli*. Os autores identificaram dois possíveis promotores, promotores P_{fus-1} e P_{fus-2}, em sítios de iniciação da transcrição a montante de *fus*. Assim como indicam que a bactéria *B. subtilis* também conta com dois promotores a montante de seus respectivos operons S10, o que pode indicar que esses dois organismos regulem a síntese de proteínas ribossômicas através de mesmos mecanismos (ZUERNER et al., 2000).

5.3.3 Processos celulares e sinalização

Na tentativa de elucidar os caminhos percorridos pelos estímulos iniciais outras classes de proteínas que despertaram o interesse foram as presentes no COG-O (Modificação pós-traducional, renovação de proteínas, chaperonas). Neste grupo foram identificadas 10 proteínas reprimidas por zinco e 17 induzidas. Dentre elas a subunidade ClpX ligadora de ATP (Q72SG5) codificada pelo gene *clpX* e a protease ClpP ATP-dependente (Q72R01, Q72SG6) ambas as duas pertencentes ao maquinário proteolítico ClpXP ATP-dependente, além da protease HslVU ATP-dependente (ClpYQ) (Q72RY7) apresentaram induzidas pelo metal.

Em bactérias, o zinco atua como componente estrutural e catalítico de diversas proteínas, dentre elas, as chaperonas (BLENCOWE; MORBY, 2003). Vias de sinalização celular são essenciais para o controle dessas proteínas, principalmente pela dúvida se o zinco é redistribuído intracelularmente por interações proteína/proteína e não no formato livre (BLENCOWE; MORBY, 2003; MARET, 2009). Implementado por Rae e colaboradores, o termo “metalochaperonas” referiu-se, naquele momento, a uma nova família de proteínas receptoras de metais solúveis do metabolismo do cobre, com função de tráfego intracelular de íons metálicos (RAE et al., 1999). As metalochaperonas de cobre não atuam como protetoras celulares para a toxicidade do metal, mas garantem a entrega do íon metálico ao seu destino evitando assim reações indevidas como a ligação do metal a sítios inespecíficos (O’HALLORAN; CULOTTA, 2000). Por outro lado, até o momento, para a correta redistribuição de zinco seria necessária uma quantidade relativamente maior de chaperonas específicas de zinco ou a necessidade de que uma mesma chaperona insira zinco em diversas proteínas (BOZYM et al., 2006). Devido ao exposto, proteínas descritas como possíveis chaperonas receberam atenção nas nossas análises.

As proteínas Clp são altamente conservadas em bactérias. Esta família desempenha funções de reguladores de proteólise, pela degradação de proteínas desnaturadas por proteases dependentes de ATP, ou como chaperonas moleculares. Em *E. coli*, os genes *clpP* e *clpX* estão localizados no regulon de choque térmico σ^{32} , sendo transcritos simultaneamente e induzidos pelo calor. As proteases Clp apresentam em sua estrutura duas subunidades, uma com capacidade ligação ao substrato ATPase e a outra como a subunidade catalítica S (GOTTESMAN et al., 1993).

A proteína ClpX de *E. coli* é uma metaloproteína que possui todas as atividades previstas de uma chaperona molecular, ou seja, é capaz de proteger e/ou dissociar agregados proteicos e estruturas terciárias específicas de proteínas parcialmente desnaturadas. Além disso, a ClpX pertence à família de proteínas Hsp100, altamente conservada e complexada com cátions Zn (II). Esse metal garante com que a atividade ATPase da proteína aconteça, possibilitando a oligomerização adequada pela ligação do ATP ao ClpX. Relato demonstra que na ausência de zinco, a proteína ClpX é incapaz de se ligar ao ATP. Por consequência, não realiza sua oligomerização nem ligação a ClpP (GERTH et al., 1998; ZHENG et al., 2021). A proteína ClpP está envolvida na degradação de proteínas com erro em sua conformação estrutural após exposição a estresses (GERTH et al., 1998). Dessa forma, podemos concluir que

zinco é necessário para a ligação de ClpX- ao ATP (BANECKI et al., 2001; WAWRZYNOW et al., 1995).

Mutantes de *B. subtilis* ausentes das proteínas ClpP ou ClpX apresentam seu crescimento sob condições de estresse deficiente, indicando que as proteínas desempenham funções reguladoras críticas na fisiologia e desenvolvimento celular como proteases ou chaperonas na tolerância ao estresse. Devido ao exposto, podemos sugerir que ClpXP desempenha papel regulatório na tolerância ao estresse causado pela ausência de zinco (GERTH et al., 1998).

Em *E. coli*, ClpYQ também é chamada de HslVU sendo codificado pelo operon *hslVU* fortemente induzido por choque térmico (BOCHTLER et al., 2000). Tendo como principal função degradar proteínas mau enoveladas durante situações de stress ao choque térmico. Em bactérias como *Staphylococcus aureus*, estudos demonstram que ClpYQ apresenta impacto menor na virulência exercendo função de protease dependente de ATP (FREES; THOMSEN; INGMER, 2005). Em outros organismos como *Bacillus cereus*, ClpYQ já foi relacionado como elemento formador de biofilme (YAN et al., 2017).

Recentemente, foi realizado um estudo comparativo entre os transcriptoma e proteoma, obtidos em condições de disponibilidade e carência de Zn^{2+} , de mutantes de *Mycobacterium smegmatis* para genes codificantes de proteínas ribossomais alternativas (AltRPs). Dentre os genes induzidos transcricionalmente em ambas as cepas, destaca-se a protease ClpP. Porém, ClpP tradicionalmente só foi diferencialmente expresso em $\Delta altRP$. Visto isso, os autores sugerem que em condições de carência de Zn, a expressão de AltRP pode auxiliar a manter a tradução dos sistemas de proteases (DOW et al., 2022).

Outra proteína que consta como induzida por zinco na análise proteômica é a co-chaperona GroES (COG0234). Pertencente à família de chaperoninas HSP60/HSP10, esta proteína demonstrou interagir com cerca de 250 proteínas diferentes, que ao todo representam mais de 10% das proteínas presentes no citosol, ao formar um complexo obrigatório com a proteína GroEL (complexo GroESL) (CASTANIÉ-CORNET; BRUEL; GENEVAUX, 2014). A proteína GroES desempenha função relacionada no enovelamento dependente de ATP de proteínas recém sintetizadas (RADFORD, 2006). Níveis aumentados de GroEL podem ser encontrados devido ao acúmulo de proteínas dobradas erroneamente que não podem ser degradadas pela protease ClpXP.

A membrana externa da *Leptospira* é um componente estrutural essencial composta de lipoproteínas, lipopolissacarídeos, fosfolipídios, peptideoglicanos altamente reticulado e

proteínas integrais de membrana β -barril. Todos conhecidos por seu poder antigênicos (HSU; YANG, 2022; NIKAIDO, 2003). Dentre as proteínas ancoradas na membrana de bactérias e encarregadas pela aquisição de zinco em situações de restrição ao metal está a família de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC) (LAM et al., 2022).

A análise funcional do genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni revela a presença 30 transportadores ABC (composto por 53 proteínas totais), dos quais 21 sistemas ABC de efluxo e 9 são sistemas ABC de captação (NASCIMENTO et al., 2004). Este grupo de proteínas de transporte é considerado a maior família de proteínas em *L. interrogans*. Dentre os sistemas que garantem a liberação de lipoproteínas maduras da membrana interna para a externa está o chamado sistema Lol formado por componentes LolABCDE, de suma importância para a biogênese de uma membrana externa. O complexo LolCDE fornece a energia para o transporte de lipoproteínas para LolA. Esta, por sua vez, transporta pelo periplasma para LolB, que realiza a inserção da lipoproteína na membrana externa (GRABOWICZ; SILHAVY, 2017; YAKUSHI et al., 2000). Sendo assim, podemos inferir que o mau funcionamento do maquinário LolCDE leva a uma perda de viabilidade bacteriana e lise celular pelo desequilíbrio da biogênese da membrana externa, a partir de estudos com inibidores desse sistema em *Escherichia coli* (LORENZ; DOUGHERTY; LORY, 2016; NICKERSON et al., 2018). A proteína Q72VR3 codificada pelo gene *lolD*, se encontra induzida por zinco em nossas análises.

A proteína do tipo BolA (Q72RD8) foi recentemente descrita em *E. coli* como um fator ativo de transcrição bacteriano que se liga diretamente na região promotora de diversos genes, atuando como ativador ou repressor da transcrição. Dentre os genes regulados por BolA genes associados negativamente a biossíntese do flagelo apresentando impacto direto na motilidade bacteriana. Além disso, BolA em *E. coli* está relacionada com a indução da formação de biofilme, iniciando a adesão para a formação de comunidades bacterianas estruturadas (DRESSAIRE et al., 2015). Está proteína também já foi relacionada com a preservação da morfologia celular em condições de estresse, como a carência nutricional e a fase estacionária de crescimento (SANTOS et al., 2002). A proteína teve sua expressão induzida por zinco nas condições experimentais deste trabalho.

A proteína Q72VE7 presente no COG-V – Mecanismos de defesa, é categorizada como NosF (Componente ATPase do sistema de transporte multidroga do tipo ABC) e foi reprimido por zinco nos achados proteômicos. O gene *nosF* se encontra em operon *nosDFY*. Dentro do operon, os genes Y e F são responsáveis pela codificação de um transportador de cassete de ligação de ATP (ABC), já *nosD* está relacionada com a maturação do sítio CuZ

(HEIN; SIMON, 2019). Além disso, NosR (membrana citoplasmática) e NosF (citoplasma) são peças importantes na montagem do cromóforo de cobre de NosZ (FROSTEGÅRD et al., 2021).

Dados na literatura sugerem uma relação estreita entre a disponibilidade de zinco e a motilidade bacteriana. A motilidade e a quimiotaxia são importantes para muitos organismos patogênicos colonizarem e/ou causarem doenças. No patógeno *Salmonella enterica* sv Typhimurium, em condições de cultivo com baixas concentrações de zinco, foi constatado uma severa redução na captação de zinco (sistema ZnuABC). Como resultado, a bactéria apresentou motilidade reduzida e baixa capacidade em arquitetar biofilmes *in vitro* devido a regulação negativa por ZnuABC de genes envolvidos na biossíntese dos flagelos (AMMENDOLA et al., 2016). Somasse a isso, experimentos de infecção em animal modelo de infecção gastrointestinal que apresentaram redução da virulência da cepa mutante para deleção de *znuABC* provavelmente em função a perda da motilidade no ambiente com carência de zinco. Diante o exposto, os autores concluem que zinco é necessário para a expressão do flagelo e montagem de biofilme em *Salmonella enterica* sv Typhimurium (AMMENDOLA et al., 2016).

Em nosso estudo podemos constatar que entre as proteínas detectadas em COG-N (Motilidade) 4 apresentaram níveis mais altos (sendo reprimidas por zinco) e 7 proteínas níveis mais baixos (induzidas por zinco) na condição TPA quando comparada com zinco. Soma-se a isso, a presença de 4 proteínas do COG-N exclusivas da condição de cultivo suplementada com TPA. Esses dados indicam uma relação dinâmica entre a motilidade bacteriana e a presença/ausência de zinco.

Dentre as proteínas reprimidas por zinco está a GTPase de biossíntese flagelar FlhF (Q72SK4) e o fator de montagem flagelar FliW (Q72MJ5), e induzidas por zinco está a proteína de biossíntese flagelar/sistema de secreção tipo III FliH (Q72SI8). A proteína FlhF interage com FlhG e ambas atuam como fatores de regulação do número de flagelos da bactéria, sendo FlhF um regulador positivo e FlhG negativo (KAZMIERCZAK; HENDRIXSON, 2013). Na espiroqueta *B. burgdorferi* FlhF também está envolvida na regulação do número e posição dos endoflagelos da bactéria (ZHANG et al., 2020). Dados na literatura observam que o aumento do número de flagelos é induzido por decorrência da superexpressão de FlhF ou uma perda de FlhG. Por outro lado, a superexpressão de FlhG ou uma perda de FlhF desencadeia em distúrbios como a localização flagelar defeituosa ou redução/falta do desenvolvimento do flagelo (ALTEGOER et al., 2014). Na bactéria gram-positiva *B. subtilis*, FliW controla a síntese de flagelina em um sistema de autorregulação homeostática regulado pela própria flagelina (MUKHERJEE et al., 2011).

Dentro do mesmo COG-N, também observamos a presença da proteína de quimiotaxia CheX (Q8F2A0) induzida por zinco. A família de proteínas CheX está envolvida na catalisação da fosforilação de CheY, sendo assim, importante para respostas quimiotáticas aceleradas. Na medida em que a proteína CheY-P é formada, o perfil de natação da bactéria é induzido pois essa proteína é responsável pelo controle do sentido de rotação dos flagelos por sua ligação ao motor flagelar (PARK et al., 2004). A proteína CheX já foi descrita como fator importante na patogênese da bactéria *Borrelia burgdorferi*, causadora da doença de Lyme, demonstrando um papel essencial de CheX na via quimiossensorial desse patógeno (MOTALEB et al., 2005). Nas espiroquetas *Trepanoma denticola* e *B. burgdorferi*, *cheX* foi identificado como pertencente de operons de quimiotaxia (SZURMANT; ORDAL, 2004).

Um resultado bastante peculiar foi a presença de proteínas relacionadas com a biossíntese dos *pili* bacterianos em ambas as condições experimentais. Sendo elas: proteína de montagem de *pilus* tipo IV (Q72S09), ATPase PilM, proteína de montagem de *pilus* tipo IV PilF/PilW (Q72PK3) e ATPase do sistema de secreção tipo II GspE/PulE ou ATPase de montagem de *pilus* do sistema de secreção tipo IV PilB (Q72S16) induzidas por zinco e proteína de montagem de *pilus* tipo IV PilF/PilW (Q72W16) e proteína de montagem de *pilus* tipo IV, pilina PilA (Q72S14) reprimidas por zinco. A exposição excessiva ao zinco ativa diversos fatores de virulência em *P. aeruginosa*, dentre eles fatores envolvidos com a motilidade (*pili* tipo IV e flagelos). Os autores confirmaram por qPCR que a exposição ao zinco aumentou significativamente a expressão em nível transcricional de genes de *pili* tipo IV (*pilB/D* e *fimV*), e também o aumento da expressão do principal gene de regulação do flagelo *fliA*. Dessa forma, os autores concluem que a superexpressão desses fatores confere à *P. aeruginosa* maior competência de aderir ao epitélio, resultando na colonização do hospedeiro (WU et al., 2021).

Relatos da literatura demonstram que a proteína Calprotectina secretada pelo hospedeiro modula as interações *H. pylori*-hospedeiro e também o funcionamento do sistema de secreção cag Tipo IV (cag T4SS) devido ao sequestro de zinco (GADDY et al., 2014).

Os membros da via de sinalização do diguanilato cíclico (c-di-GMP), COG2200 (Q72RQ3) Domínio EAL, fosfodiesterase específica de c-di-GMP classe I (ou sua variante enzimaticamente inativa) e COG2206 (Q72M93) Domínio HD-GYP, c-di-GMP fosfodiesterase classe II (ou sua variante inativada) foram identificados como proteínas exclusivas na condição de crescimento TPA. O diguanilato cíclico (c-di-GMP) é um segundo mensageiro intracelular, que desempenha papel relacionada com a regulação de genes e vias para a adaptação de microrganismos à ambientes extracelulares em resposta a situações atípicas. O c-di-GMP é

descrito por beneficiar a condição de vida sésil a partir da regulação de genes envolvidos com a formação de biofilme, virulência bacteriana, motilidade entre outros (COTTER; STIBITZ, 2007; HENGGE, 2009). Por outro lado, baixos níveis de c-di-GMP também ativam vias de virulência, reforçando a importância do c-di-GMP na sinalização celular bacteriana (HENGGE, 2009).

No entanto, é necessário amplo estudo para o entendimento completo das vias de sinalização c-di-GMP, uma vez que as bactérias podem codificar diversas proteínas como c-di-GMP sintase (diguanilato ciclase ou DGC) e hidrolase (fosfodiesterase ou enzimas PDE). As mutações e diferença de expressão em condição de estresses em sua maioria não resultam em alterações observáveis no fenótipo devido a efeitos compensatórios de outras enzimas DGC e/ou PDE expressas pelo agente (TAMAYO, 2013).

Devido ao grande impacto causado pelas condições experimentais em diversas proteínas envolvidas na motilidade e quimiotaxia, elaboramos um protocolo para analisar o perfil fenotípico de *L. interrogans* exposta a zinco e TPA (Dados não mostrados). Para avaliar esta condição de forma fisiológica, a *L. interrogans* foi cultivada em meio EMJH sólido na presença de zinco ou TPA para avaliar o impacto desses agentes estressantes a sua motilidade. Após 21 dias, observou-se colônia de perfil concêntrico que se afastou do ponto de inoculação, indicando assim células competentes em motilidade. Porém, ao comparar as duas condições de crescimento, não se observou uma diferença significativa. Dessa forma, podemos concluir que a biogênese flagelar é um processo complexo, regulado e coordenado por diversas proteínas. Podendo assim, ocorrer uma compensação funcional das proteínas devido ao estresse causado ao organismo.

5.3.4 Mal caracterizadas

Este trabalho identificou várias proteínas classificadas como hipotéticas no proteoma da bactéria. A sua maioria, não apresenta similaridade com proteínas já descritas, mostrando assim a forma única com que a bactéria se adapta a diferentes condições.

Além disso, os resultados obtidos por LC-MS/MS destacam a presença de 38 proteínas no COG-R (Apenas previsão funcional geral). Dentre essas, realizamos buscas a fim de encontrar uma proteína presente no COG0523. Descrito como presente em todos os reinos da vida, as proteínas COG0523 estão presentes em ilhas de patogenicidades nos genomas bacterianos e relacionadas com a sobrevivência de patógenos em situações de hipozincemia induzida pelo hospedeiro (imunidade nutricional). Além de apresentarem genes codificantes

de COG0523 a jusante dos sítios de ligação putativos de Zur (HAAS et al., 2009). Porém, nas condições desse trabalho, nenhuma proteína presente no COG0523 foi identificada.

Por outro lado, revisando melhor a função das 18 proteínas reprimidas por zinco dentro do COG-R, notamos a presença de 3 proteínas de ligação a peptidoglicano, não caracterizadas, mas com a presença de domínios lisina (LysM) sendo elas Q72RB4 (FC 4.88), Q72T99 (FC 3.02). E também uma proteína com domínio FecR, a proteína Q75FR7 (FC 1.73). O motivo LysM foi primeiramente reportado na literatura por estar presente em enzimas com capacidade de degradar as paredes celulares de bactérias estudada nos organismos *Enterococcus hirae* e *Enterococcus faecalis* (JORIS et al., 1992). Inúmeras proteínas compostas por domínios LysM desempenham papel na patogênese de bactérias como: *E. coli* (BATEMAN; BYCROFT, 2000), *Listeria monocytogenes* (DUSSURGET; PIZARRO-CERDA; COSSART, 2004), *Staphylococcus aureus* (GOWARD et al., 1993) entre outros. As evidências demonstram que LysM é um motivo geral de afinidade ao peptidoglicano tipo A e B, estando assim associada à superfície celular e também secretadas por bactérias simbióticas (BUIST et al., 2008).

O FecR é um regulador da membrana citoplasmática dos sistemas de absorção de ferro. Após receber um sinal emitido por FecA, o regulador FecR ativa o fator sigma FecI, fazendo com que a RNA polimerase se direcione para o promotor do operon *fecABCDE*. Induzindo a expressão de genes de transporte de citrato férrico. Em *E. coli* a transcrição de genes de transporte do tipo Fec é reprimida pela proteína Fur quando ligada a Fe^{2+} (BRAUN; MAHREN; OGIERMAN, 2003). A sobreposição de proteínas relacionadas com a homeostase de ferro já era esperada uma vez que de que Fur é uma proteína de ligação ao Zn (II) sugerindo uma ligação na homeostase do Zn (II) e do ferro (ALTHAUS et al., 1999).

Visto Isso, podemos constar uma parcela notável do proteoma Zn não apresentou função putativa, reforçando a questão de que o papel dos metais em inúmeros eventos celulares está além do conhecimento atual. Sendo assim, a grande quantidade de proteínas não caracterizadas obtidas, acentua a necessidade de análise funcional detalhada para a melhor compreensão das suas funções.

Além disso, é importante lembrar que o papel de zinco na célula está relacionado com a estabilidade e dobramento correto de diversas proteínas e também como catalisador para enzimas (BLENCOWE; MORBY, 2003). O refinado processo de aquisição e extrusão de zinco é realizado pelas bactérias uma vez que o zinco em níveis tóxicos apresenta atividade antimicrobiana e a sua ausência impacta diretamente em dezenas de processos celulares como os revisados nessa sessão. Esse processo é controlado por reguladores transcricionais sensitivos

ao metal que se ligam ao DNA alvo, reprimindo a transcrição (LEE; HELMANN, 2007). Ao contrário de metais como o ferro, cátion bivalente zinco não altera sua oxidação em condições fisiológicas, sendo assim, não possui atividade redox. Porém, o zinco apresenta função na sinalização redox. Primeiramente, o metal tem a capacidade de reduzir a oxidação de resíduos de cisteína após a ligação com zinco (reatividade diminuída pela ação como ácido de Lewis). A ação desse metal como ácido de Lewis, se refere a sua aceitação de pares de elétrons ou atração e estabilização de cargas negativas providas pelos substratos (ANDREINI et al., 2008). Em segundo modo, o zinco é considerado um segundo mensageiro na cascata de sinalização dependente de redox, que ocorre posterior à liberação oxidativa de complexos de tiolato de zinco (HÜBNER; HAASE, 2021).

As proteínas identificadas nesse trabalho como presentes apenas na condição de crescimento com zinco foram pouco abordadas devido ao fato de a concentração suplementada ser próxima a presente no meio de cultura para leptospiros. Dessa forma, nas condições desse trabalho, não foi simulado um ambiente tóxico para o organismo. Para mais, o zinco é conhecido por sua capacidade de deslocar metais facilmente (exceto cobre. Dessa forma, sua presença desencadeia na transdução de sinal cruzada, sobrepondo assim, muitos processos e vias discutidas nas outras condições (ANDREINI et al., 2008).

Uma compreensão mais profunda dos mecanismos envolvidos na resistência ao zinco é importante para desvendar como as leptospiros sentem e respondem aos diversos microambientes. Além disso, tais fatores impulsionam a necessidade de definir mecanismos de virulência, estratégias de adaptação ambiental e descobrir novas opções terapêuticas.

6 CONCLUSÃO

O foco principal de nossa investigação foi estudar a resposta do proteoma de *Leptospira interrogans* à exposição externa de metais e perfil diferencial de expressão de proteínas em uma abordagem global. Nossos dados revelaram uma dinâmica no proteoma da bactéria, impactando em diversos processos celulares. As principais conclusões do trabalho foram:

- Em *L. interrogans*, a carência de zinco afeta vias importantes para o metabolismo bacteriano. Dentre elas, o metabolismo de compostos de 1 carbono, a via de biossíntese do folato e a biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos.
- As alterações da disponibilidade de zinco induzem a síntese de proteínas ribossomais e parálogos em *L. interrogans*.
- Proteínas descritas como chaperonas moleculares são induzidas na presença de zinco por *L. interrogans*.
- A tolerância a zinco em *L. interrogans* é constituída por uma rede ramificada de diversos mecanismos de adaptação extracelular e intracelular, dentre eles, motilidade e quimiotaxia.
- Proteínas pertencentes a Sistemas do tipo ABC apresentaram-se induzidas por zinco nas condições desse trabalho.
- Este trabalho identificou várias proteínas classificadas como hipotéticas no proteoma da bactéria. A sua maioria, não apresenta similaridade com proteínas já descritas, reforçando a importância de maiores estudos para a compreensão de seu papel na tolerância ao zinco.

7 REFERÊNCIAS

ADESIYUN, Abiodun Adewale et al. Human leptospirosis in the Caribbean, 1997-2005: characteristics and serotyping of clinical samples from 14 countries. **Revista panamericana de salud publica**, v. 29, p. 350-357, 2011.

ADLER, B. LEVETT, P. N. *Leptospira* and Leptospirosis. Systematics of Leptospiraceae. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 387, p. 11-20, 2015.

ADLER, Ben; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, Alejandro. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.

AKANUMA, Genki et al. Liberation of zinc-containing L31 (RpmE) from ribosomes by its paralogous gene product, *YtiA*, in *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 7, p. 2715-2720, 2006

ALTEGOER, Florian et al. From molecular evolution to biobricks and synthetic modules: a lesson by the bacterial flagellum. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 30, n. 1, p. 49-64, 2014.

ALTERI, Christopher J. et al. Mucosal immunization with iron receptor antigens protects against urinary tract infection. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 9, p. e1000586, 2009.

ALTHAUS, Ellen Wang et al. The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. **Biochemistry**, v. 38, n. 20, p. 6559-6569, 1999.

AMAMURA, Thais A. et al. Pathogenic *Leptospira* secreted proteases target the membrane attack complex: a potential role for thermolysin in complement inhibition. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 958, 2017.

AMMENDOLA, Serena et al. High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. **Infection and immunity**, v. 75, n. 12, p. 5867-5876, 2007.

AMMENDOLA, Serena et al. Zinc is required to ensure the expression of flagella and the ability to form biofilms in *Salmonella enterica* sv Typhimurium. **Metallomics**, v. 8, n. 10, p. 1131-1140, 2016.

ANDREINI, Claudia et al. Zinc through the three domains of life. **Journal of proteome research**, v. 5, n. 11, p. 3173-3178, 2006.

ANDREINI, Claudia et al. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1205-1218, 2008.

ANDREINI, Claudia; BERTINI, Ivano; ROSATO, Antonio. Metalloproteomes: a bioinformatic approach. **Accounts of chemical research**, v. 42, n. 10, p. 1471-1479, 2009.

ATZINGEN, Marina V. et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2008.

BAKER-AUSTIN, Craig et al. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends in microbiology**, v. 14, n. 4, p. 176-182, 2006.

BALASUBRAMANIAN, Deepak et al. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 1, p. 1-20, 2013.

BANECKI, Bogdan et al. Structure-function analysis of the zinc-binding region of the ClpX molecular chaperone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 22, p. 18843-18848, 2001.

BARBOSA, Angela S. et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infection and immunity**, v. 74, n. 11, p. 6356-6364, 2006.

BARBOSA, Angela S. et al. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infection and immunity**, v. 78, n. 7, p. 3207-3216, 2010.

BAROCCHI, Michele A. et al. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 6926-6932, 2002.

BATEMAN, Alex; BYCROFT, Mark. The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). **Journal of molecular biology**, v. 299, n. 4, p. 1113-1119, 2000.

BHARTI, Ajay R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BIERQUE, Emilie et al. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. **PloS one**, v. 15, n. 1, 2020.

BLENCOWE, Dayle K.; MORBY, Andrew P. Zn (II) metabolism in prokaryotes. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 2-3, p. 291-311, 2003.

BOCHTLER, Matthias et al. The structures of HslU and the ATP-dependent protease HslU–HslV. **Nature**, v. 403, n. 6771, p. 800-805, 2000..

BOTELLA, H el ene et al. Metallobiology of host–pathogen interactions: an intoxicating new insight. **Trends in microbiology**, v. 20, n. 3, p. 106-112, 2012.

BOURHY, Pascale et al. Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a mariner transposon. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 9, p. 3255-3258, 2005.

BOZYM, Rebecca A. et al. Measuring picomolar intracellular exchangeable zinc in PC-12 cells using a ratiometric fluorescence biosensor. **ACS chemical biology**, v. 1, n. 2, p. 103-111, 2006.

BRAUN, Volkmar; MAHREN, Susanne; OGIERMAN, Monica. Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 2, p. 173-180, 2003.

BRUINS, Mark R.; KAPIL, Sanjay; OEHME, Frederick W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 45, n. 3, p. 198-207, 2000.

BRUMBAUGH, Ariel R.; SMITH, Sara N.; MOBLEY, Harry LT. Immunization with the yersiniabactin receptor, FyuA, protects against pyelonephritis in a murine model of urinary tract infection. **Infection and immunity**, v. 81, n. 9, p. 3309-3316, 2013.

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

CAILLE, Olivier; ROSSIER, Claude; PERRON, Karl. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 13, p. 4561-4568, 2007.

CAPDEVILA, Daiana A.; WANG, Jiefei; GIEDROC, David P. Bacterial strategies to maintain zinc metallostasis at the host-pathogen interface. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 40, p. 20858-20868, 2016.

CASTANIÉ-CORNET, Marie-Pierre; BRUEL, Nicolas; GENEVAUX, Pierre. Chaperone networking facilitates protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 8, p. 1442-1456, 2014.

CHANDRANGSU, Pete et al. *Bacillus subtilis* FolE is sustained by the ZagA zinc metallochaperone and the alarmone ZTP under conditions of zinc deficiency. **Molecular microbiology**, v. 112, n. 3, p. 751-765, 2019.

CHENG-GUANG, He; GUALERZI, Claudio Orlando. The ribosome as a switchboard for bacterial stress response. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 619038, 2021.

CHOY, Henry A. Multiple activities of LigB potentiate virulence of *Leptospira interrogans*: inhibition of alternative and classical pathways of complement. **PLoS one**, v. 7, n. 7, p. e41566, 2012.

CHUNG, Myung-Chul et al. Secreted neutral metalloproteases of *Bacillus anthracis* as candidate pathogenic factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 42, p. 31408-31418, 2006.

COSTA, Federico et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003898, 2015.

COTTER, P. A.; STIBITZ, S. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 1, p. 17–23, 2007.

CRODA, Julio et al. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infection and immunity**, v. 76, n. 12, p. 5826-5833, 2008.

CRODA, Julio et al. Leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 593-599, 2010.

CULLEN, Paul A.; HAAKE, David A.; ADLER, Ben. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 291-318, 2004.

DANCHIN, Antoine; SEKOWSKA, Agnieszka; YOU, Conghui. One-carbon metabolism, folate, zinc and translation. **Microbial biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 899-925, 2020.

DAROZ, Brenda B. et al. A review on host-*Leptospira* Interactions: What we know and future expectations. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 1179, 2021.

DELLAGOSTIN, Odir A. et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1215-1224, 2011.

DESROSIERS, Daniel C. et al. Znu is the predominant zinc importer in *Yersinia pestis* during in vitro growth but is not essential for virulence. **Infection and immunity**, v. 78, n. 12, p. 5163-

5177, 2010.

DOW, Alexa et al. Multi-Omics Profiling Specifies Involvement of Alternative Ribosomal Proteins in Response to Zinc Limitation in *Mycobacterium smegmatis*. **Frontiers in microbiology**, v. 13, 2022.

DOW, Alexa; PRISIC, Sladjana. Alternative ribosomal proteins are required for growth and morphogenesis of *Mycobacterium smegmatis* under zinc limiting conditions. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. e0196300, 2018.

DRESSAIRE, Clémentine et al. *BolA* is a transcriptional switch that turns off motility and turns on biofilm development. **MBio**, v. 6, n. 1, p. e02352-14, 2015.

DUSSURGET, Olivier; PIZARRO-CERDA, Javier; COSSART, Pascale. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Annual review of microbiology**, v. 58, p. 587, 2004.

ELLIS, William A. Animal leptospirosis. **Leptospira and leptospirosis**, p. 99-137, 2015.

EVANGELISTA, Karen V.; COBURN, Jenifer. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future microbiology**, v. 5, n. 9, p. 1413-1425, 2010.

FERNANDES, Luis GV et al. OmpL1 is an extracellular matrix-and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. **Infection and immunity**, v. 80, n. 10, p. 3679-3692, 2012.

FERNANDES, Luis GV et al. Evaluation of LipL32 and LigA/LigB knockdown mutants in *Leptospira interrogans* serovar copenhageni: impacts to proteome and virulence. **Frontiers in microbiology**, v. 12, 2021.

FILLAT, María F. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 546, p. 41-52, 2014.

FRAGA, Tatiana Rodrigues et al. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 6, p. 876-886, 2014.

FRAGA, T. R. et al. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 6, p. 876–886, 2014.

FRAGA, Tatiana Rodrigues; BARBOSA, Angela Silva; ISAAC, Lourdes. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scandinavian journal of immunology**, v. 73, n. 5, p. 408-419, 2011.

FRAGA, Tatiana Rodrigues; ISAAC, Lourdes; BARBOSA, Angela Silva. Complement evasion by pathogenic *Leptospira*. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 623, 2016.

FREES, Dorte; THOMSEN, Line E.; INGMER, Hanne. *Staphylococcus aureus* ClpYQ plays a minor role in stress survival. **Archives of microbiology**, v. 183, n. 4, p. 286-291, 2005.

FROSTEGÅRD, Åsa et al. Linking meta-omics to the kinetics of denitrification intermediates reveals pH-dependent causes of N₂O emissions and nitrite accumulation in soil. **The ISME journal**, v. 16, n. 1, p. 26-37, 2022.

GADDY, Jennifer A. et al. The host protein calprotectin modulates the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system via zinc sequestration. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004450, 2014.

GAETKE, L. M. et al. Effects of endotoxin on zinc metabolism in human volunteers. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 272, n. 6, p. E952-E956, 1997.

GERTH, Ulf et al. Stress induction of the *Bacillus subtilis* *clpP* gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. **Molecular microbiology**, v. 28, n. 4, p. 787-802, 1998.

GOTTESMAN, Susan et al. ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and in vivo activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 30, p. 22618-22626, 1993.

GOUVEIA, Edilane L. et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 3, p. 505, 2008.

GOWARD, Christopher R. et al. Molecular evolution of bacterial cell-surface proteins. **Trends in biochemical sciences**, v. 18, n. 4, p. 136-140, 1993.

GRABOWICZ, Marcin; SILHAVY, Thomas J. Redefining the essential trafficking pathway for outer membrane lipoproteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 18, p. 4769-4774, 2017.

GRASSMANN, André A. et al. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Clinical and vaccine immunology**, v. 19, n. 5, p. 740-745, 2012.

GREEN, Jeffrey; ROLFE, Matthew D.; SMITH, Laura J. Transcriptional regulation of bacterial virulence gene expression by molecular oxygen and nitric oxide. **Virulence**, v. 5, n. 8, p. 794-809, 2014.

HAAKE, David A. et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

LEVETT, Paul N. Systematics of leptospiroaceae. **Leptospira and Leptospirosis**, p. 11-20, 2015.

HAAKE, David A.; MATSUNAGA, James. Leptospiral immunoglobulin-like domain proteins: Roles in virulence and immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 579907, 2021.

HAAS, Crysten E. et al. A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 1-21, 2009.

HAYASHI, Shoko et al. The dsbA-dsbB disulfide bond formation system of *Burkholderia cepacia* is involved in the production of protease and alkaline phosphatase, motility, metal resistance, and multi-drug resistance. **Microbiology and immunology**, v. 44, n. 1, p. 41-50, 2000.

HEIN, Sascha; SIMON, Jörg. Bacterial nitrous oxide respiration: electron transport chains and copper transfer reactions. **Advances in microbial physiology**, v. 75, p. 137-175, 2019.

HENGGE, Regine. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 263-273, 2009.

HENSLEY, M. Patrick; TIERNEY, David L.; CROWDER, Michael W. Zn (II) binding to *Escherichia coli* 70S ribosomes. **Biochemistry**, v. 50, n. 46, p. 9937-9939, 2011.

HOOD, M. Indriati; SKAAR, Eric P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 525-537, 2012.

HSU, Shen-Hsing; YANG, Chih-Wei. Insight into the Structure, Functions, and Dynamics of the *Leptospira* Outer Membrane Proteins with the Pathogenicity. **Membranes**, v. 12, n. 3, p. 300, 2022.

HÜBNER, Christopher; HAASE, Hajo. Interactions of zinc-and redox-signaling pathways. **Redox biology**, v. 41, p. 101916, 2021.

JORIS, Bernard et al. Modular design of the *Enterococcus hirae* muramidase-2 and *Streptococcus faecalis* autolysin. **FEMS microbiology letters**, v. 91, n. 3, p. 257-264, 1992.

KAZMIERCZAK, Barbara I.; HENDRIXSON, David R. Spatial and numerical regulation of flagellar biosynthesis in polarly flagellated bacteria. **Molecular microbiology**, v. 88, n. 4, p. 655-663, 2013.

KEMNA, Erwin et al. Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1864-1866, 2005.

KO, Albert I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **The Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820-825, 1999.

KUMAR, Jitendra; KUMAR, Vijay. Ribosome proteins—Their balanced production. In: **Emerging Concepts in Ribosome Structure, Biogenesis, and Function**. Academic Press, 2021. p. 47-87.

LAM, Ling Ning et al. The AdcACB/AdcAII system is essential for zinc homeostasis and an important contributor of *Enterococcus faecalis* virulence. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 592-608, 2022.

LAMBERT, Ambroise et al. FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. **Infection and immunity**, v. 80, n. 6, p. 2019-2025, 2012.

LEE, Jin-Won; HELMANN, John D. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. **Biometals**, v. 20, n. 3, p. 485-499, 2007.

LI, Yunlong et al. Zinc depletion induces ribosome hibernation in mycobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 32, p. 8191-8196, 2018.

LORENZ, Christian; DOUGHERTY, Thomas J.; LORY, Stephen. Transcriptional responses of *Escherichia coli* to a small-molecule inhibitor of LolCDE, an essential component of the lipoprotein transport pathway. **Journal of bacteriology**, v. 198, n. 23, p. 3162-3175, 2016.

MAKTHAL, Nishanth; KUMARASWAMI, Muthiah. Zinc'ing it out: zinc homeostasis mechanisms and their impact on the pathogenesis of human pathogen group A *streptococcus*. **Metalomics**, v. 9, n. 12, p. 1693-1702, 2017.

MARET, Wolfgang. Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals. **Biomaterials**, v. 22, n. 1, p. 149-157, 2009.

MARET, Wolfgang. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. **Advances in nutrition**, v. 4, n. 1, p. 82-91, 2013.

MASSÉ, Eric; VANDERPOOL, Carin K.; GOTTESMAN, Susan. Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 20, p. 6962-6971, 2005.

MCBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis: current opinion in infectious diseases. **Pmid**, v. 18, p. 376-386, 2005.

MCCLAIN, J. BRUCE L. et al. Doxycycline therapy for leptospirosis. **Annals of internal medicine**, v. 100, n. 5, p. 696-698, 1984.

MIKHAYLINA, Alevtina et al. Bacterial zinc uptake regulator proteins and their regulons. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 4, p. 983-1001, 2018.

MIYOSHI, Shin-ichi. Extracellular proteolytic enzymes produced by human pathogenic *Vibrio* species. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 339, 2013.

MOORE, Charles M. et al. Genetic and physiological responses of *Bacillus subtilis* to metal ion stress. **Molecular microbiology**, v. 57, n. 1, p. 27-40, 2005.

MOTALEB, M. A. et al. CheX is a phosphorylated CheY phosphatase essential for *Borrelia burgdorferi* chemotaxis. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 23, p. 7963-7969, 2005.

MUKHERJEE, Sampriti et al. CsrA–FliW interaction governs flagellin homeostasis and a checkpoint on flagellar morphogenesis in *Bacillus subtilis*. **Molecular microbiology**, v. 82, n. 2, p. 447-461, 2011.

MURPHY, Timothy F. et al. ATP-binding cassette (ABC) transporters of the human respiratory

tract pathogen, *Moraxella catarrhalis*: role in virulence. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p. e0158689, 2016.

MURRAY, Gerald L. et al. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 3, p. 952-958, 2009.

MURRAY, Gerald L. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. **Veterinary microbiology**, v. 162, n. 2-4, p. 305-314, 2013.

NASCIMENTO, Ana Lucia Tabet Oller do et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 459-477, 2004.

NASCIMENTO, A. L. T. O. et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164-2172, 2004.

NICKERSON, Nicholas N. et al. A novel inhibitor of the LolCDE ABC transporter essential for lipoprotein trafficking in Gram-negative bacteria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 4, p. e02151-17, 2018.

NIES, Dietrich H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 2-3, p. 313-339, 2003.

NIKAIDO, Hiroshi. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4, p. 593-656, 2003.

O'HALLORAN, Thomas V.; CULOTTA, Valeria Cizewski. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 33, p. 25057-25060, 2000.

ONG, Cheryl-lynn Y.; WALKER, Mark J.; MCEWAN, Alastair G. Zinc disrupts central carbon

metabolism and capsule biosynthesis in *Streptococcus pyogenes*. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2015.

OUTTEN, Caryn E.; O'HALLORAN, and Thomas V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. **Science**, v. 292, n. 5526, p. 2488-2492, 2001.

OWEN, Gillian A. et al. Zinc-responsive regulation of alternative ribosomal protein genes in *Streptomyces coelicolor* involves Zur and σ R. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 11, p. 4078-4086, 2007.

PANINA, Ekaterina M.; MIRONOV, Andrey A.; GELFAND, Mikhail S. Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 17, p. 9912-9917, 2003.

PARK, Sang-Youn et al. Structure and function of an unusual family of protein phosphatases: the bacterial chemotaxis proteins CheC and CheX. **Molecular cell**, v. 16, n. 4, p. 563-574, 2004.

PICARDEAU, Mathieu et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PloS one**, v. 3, n. 2, p. e1607, 2008.

PICARDEAU, Mathieu; BRENOT, Audrey; SAINT GIRONS, Isabelle. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. **Molecular microbiology**, v. 40, n. 1, p. 189-199, 2001.

PORCHERON, Gaëlle et al. Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 90, 2013.

POSEY, James E.; GHERARDINI, Frank C. Lack of a role for iron in the Lyme disease

pathogen. **Science**, v. 288, n. 5471, p. 1651-1653, 2000.

PRESTEL, Eric; NOIROT, Philippe; AUGER, Sandrine. Genome-wide identification of *Bacillus subtilis* Zur-binding sites associated with a Zur box expands its known regulatory network. **BMC microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2015.

QUE-GEWIRTH, Nanette LS et al. 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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 24, p. 25420-25429, 2004.

RADFORD, Sheena E. GroEL: More than Just a folding cage. **Cell**, v. 125, n. 5, p. 831-833, 2006.

RAE, T. D. et al. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. **Science**, v. 284, n. 5415, p. 805-808, 1999.

REN, Shuang-Xi et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 888-893, 2003.

SAMANT, Shalaka et al. Nucleotide biosynthesis is critical for growth of bacteria in human blood. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 2, p. e37, 2008.

SANKARAN, Banumathi et al. Zinc-independent folate biosynthesis: genetic, biochemical, and structural investigations reveal new metal dependence for GTP cyclohydrolase IB. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 22, p. 6936-6949, 2009.

SANTOS, Jorge M. et al. The gene *bolA* regulates *dacA* (PBP5), *dacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1729-1740, 2002.

SEIXAS, Fabiana Kömmling et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v. 26, n.

1, p. 88-95, 2007.

SHIVAKUMAR, S. et al. Programme for Prevention and Control of Leptospirosis-National Guidelines: Diagnosis , Case Management Prevention and Control of Leptospirosis Programme for Prevention and Control of Leptospirosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 88, n. 1, p. 359–363, 2008.

SZURMANT, H.; ORDAL, G. W. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 68, n. 2, p. 301–319, jun. 2004.

TAMAYO, R. The Characterization of a Cyclic-Di-GMP (c-Di-GMP) Pathway Leads to a New Tool for Studying c-Di-GMP Metabolic Genes. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 21, p. 4779, 2013.

TANAKA, Kari J. et al. Selective substrate uptake: the role of ATP-binding cassette (ABC) importers in pathogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1860, n. 4, p. 868-877, 2018.

The spirochetes: molecular and cellular biology. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013116041>>. Acesso em: 5 jul. 2022.

THIBEAUX, Roman et al. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. **Microbial genomics**, v. 4, n. 1, 2018.

THIERMANN, A. B. The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Journal of wildlife diseases**, v. 17, n. 1, p. 39–43, 1981.

THOMAS, D. D.; HIGBIE, L. M. In vitro association of leptospire with host cells. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 3, p. 581, 1990.

TOBIASSON, V. et al. Zinc depletion does not necessarily induce ribosome hibernation in mycobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

America, v. 116, n. 7, p. 2395–2397, 2019.

TORGERSON, P. R. et al. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1–14, 2015.

TRISTÃO, Gabriel B. et al. Predicting copper-, iron-, and zinc-binding proteins in pathogenic species of the *Paracoccidioides* genus. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 761, 2015.

TROXELL, Bryan et al. Manganese and zinc regulate virulence determinants in *Borrelia burgdorferi*. **Infection and immunity**, v. 81, n. 8, p. 2743-2752, 2013.

VICTORIANO, A. F. B. et al. Leptospirosis in the Asia Pacific region. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 147, 2009.

VINCENT, A. T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 5, 2019.

WALDRON, K. J. et al. Metalloproteins and metal sensing. **Nature**, v. 460, n. 7257, p. 823–830, 2009.

WAŹŁY, J.; POTOCKI, S.; ROWIŃSKA-ŻYREK, M. Zinc Homeostasis at the Bacteria/Host Interface-From Coordination Chemistry to Nutritional Immunity. **Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 22, n. 45, p. 15992–16010, 2016.

WAWRZYNOW, A. et al. The ClpX heat-shock protein of *Escherichia coli*, the ATP-dependent substrate specificity component of the ClpP-ClpX protease, is a novel molecular chaperone. **The EMBO journal**, v. 14, n. 9, p. 1867–1877, 1995.

WIESER, A. et al. A multiepitope subunit vaccine conveys protection against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in mice. **Infection and immunity**, v. 78, n. 8, p. 3432–3442, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization, 2003.

WU, T. et al. Zinc Exposure Promotes Commensal-to-Pathogen Transition in *Pseudomonas aeruginosa* Leading to Mucosal Inflammation and Illness in Mice. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 24, 2021.

WUNDER, E. A. et al. A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete. **Molecular microbiology**, v. 101, n. 3, p. 457–470, 2016.

WUNDER JR, Elsie A. et al. FcpB is a surface filament protein of the endoflagellum required for the motility of the spirochete *Leptospira*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 130, 2018..

YAKUSHI, T. et al. A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. **Nature cell biology**, v. 2, n. 4, p. 212–218, 2000.

YAN, F. et al. Genome-Wide Investigation of Biofilm Formation in *Bacillus cereus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 83, n. 13, 2017.

ZACKULAR, J. P.; CHAZIN, W. J.; SKAAR, E. P. Nutritional Immunity: S100 Proteins at the Host-Pathogen Interface. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 31, p. 18991–18998, 2015.

ZHANG, K. et al. *FlhF* regulates the number and configuration of periplasmic flagella in *Borrelia burgdorferi*. **Molecular microbiology**, v. 113, n. 6, p. 1122–1139, 2020.

ZHENG, D. et al. Bacterial ClpP Protease Is a Potential Target for Methyl Gallate. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 3616, 2021.

ZUERNER, R. L. et al. Characterization of the *Leptospira interrogans* S10-spc- α operon. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, n. 2, p. 303–308, 2000.

8 ANEXO A: MATERIAL SUPLEMENTAR – BANCO DBBM

Genes codificantes referentes as proteínas expressas diferencialmente entre as condições TPA/zinco, identificadas nesse trabalho. Dados retirados do banco de dados DBBM (<http://www.dbbm.fiocruz.br/leptospira/info/seq/genelist-aLL.html>)

Gene ID	TPA/Zinc	Product (gene name)
I.A.2. INTERMEDIARY METABOLISM/DEGRADATION/DEGRADATION OF SMALL MOLECULES		
Q72R88	UP	-37520.1 LARGE REPLICON (2254954 2255841) (891 bp / 297 aa) 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase (mmsB)
Q72T81	UP	-19550.1 LARGE REPLICON (1407699 1405762) (1941 bp / 647 aa) alpha-galactosidase (galA)
Q72RC4	DOWN	-27710.1 LARGE REPLICON (2217543 2216149) (1398 bp / 466 aa) 3-isopropylmalate dehydratase, large subunit (leuC)
I.A.3. INTERMEDIARY METABOLISM/DEGRADATION/DEGRADATION OF LIPIDS AND FATTY ACIDS		
Q72N29	DOWN	-14290.1 LARGE REPLICON (3662893 3661223) (1674 bp / 558 aa) acyl-CoA dehydrogenase (acd)
Q72UU2	DOWN	-4440.1 LARGE REPLICON (691320 692120) (804 bp / 268 aa) enoyl-CoA hydratase (hbd1)
I.B.8. INTERMEDIARY METABOLISM/CENTRAL INTERMEDIARY/NUCLEOTIDE INTERCONVERSIONS		
Q72UV8	UP	-4320.1 LARGE REPLICON (673079 672489) (594 bp / 198 aa) Xanthosine triphosphate pyrophosphatase
I.B.13. INTERMEDIARY METABOLISM/CENTRAL INTERMEDIARY/OTHER		
Q72ML1	UP	-31340.1 LARGE REPLICON (3894539 3893754) (789 bp / 263 aa) Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase (ugpQ)
I.C.1. INTERMEDIARY METABOLISM/ENERGY METABOLISM, CARBON/AEROBIC RESPIRATION		
Q72NT4	DOWN	-12400.1 LARGE REPLICON (3341224 3341706) (486 bp / 162 aa) NADH dehydrogenase I, E subunit (nuoE)
I.C.4. INTERMEDIARY METABOLISM/ENERGY METABOLISM, CARBON/GLYCOLYSIS		
Q72NW0	UP	-12200.1 LARGE REPLICON (3308260 3308961) (705 bp / 235 aa) putative enolase-phosphatase E-1
I.C.5. INTERMEDIARY METABOLISM/ENERGY METABOLISM, CARBON/OXIDATIVE BRANCH, PENTOSE PATHWAY		

Q72QF1 UP -7550.1 LARGE REPLICON (2611069 2610413) (660 bp / 220 aa) 6-phosphogluconolactonase/glucosamine-6-phosphate isomerase/deaminase (nagB)
 Q72VI0 UP -53320.1 LARGE REPLICON (361249 361683) (438 bp / 146 aa) ribose 5-phosphate isomerase B (rpiB)

I.C.6. INTERMEDIARY METABOLISM/ENERGY METABOLISM, CARBON/*PYRUVATE DEHYDROGENASE*

Q72RE3 DOWN -27580.1 LARGE REPLICON (2196195 2197574) (1383 bp / 461 aa) dihydrolipoamide dehydrogenase (lpdA)

I.C.8. INTERMEDIARY METABOLISM/ENERGY METABOLISM, CARBON/*ATP-PROTON MOTIVE FORCE INTERCONVERSION*

Q72SY1 UP -18780.1 LARGE REPLICON (1531755 1533275) (1524 bp / 508 aa) ATP synthase, alpha chain (atpA)

I.D.1. INTERMEDIARY METABOLISM/REGULATORY FUNCTIONS/TWO COMPONENT SYSTEMS

Q72UV0 UP -4380.1 LARGE REPLICON (681980 682660) (684 bp / 228 aa) response regulator
 Q72UH9 UP -5230.1 LARGE REPLICON (822285 823415) (1134 bp / 378 aa) response regulator
 Q72SD9 DOWN -17310.1 LARGE REPLICON (1780063 1781052) (993 bp / 331 aa) response regulator
 Q72T20 DOWN -19060.1 LARGE REPLICON (1480899 1481354) (459 bp / 153 aa) response regulator

I.D.2. INTERMEDIARY METABOLISM/REGULATORY FUNCTIONS/*ACTIVATORS/REPRESSORS*

Q75FU9 DOWN -78.1 SMALL REPLICON (92473 93486) (1017 bp / 339 aa) transcriptional regulator (ArsR family)

I.D.3. INTERMEDIARY METABOLISM/REGULATORY FUNCTIONS/*KINASES/PHOSPHATASES*

Q72SX5 DOWN -18740.1 LARGE REPLICON (1539649 1541802) (2157 bp / 719 aa) cGMP-specific phosphodiesterase

I.D.5. INTERMEDIARY METABOLISM/REGULATORY FUNCTIONS/OTHER

Q72N12 UP -14430.1 LARGE REPLICON (3689402 3688701) (705 bp / 235 aa) ThiJ/PfpI family protein
 Q72VM9 DOWN -2260.1 LARGE REPLICON (305683 305021) (666 bp / 222 aa) cyclic nucleotide binding protein

II.A.1. BIOSYNTHESIS OF SMALL MOLECULES/AMINO ACIDS BIOSYNTHESIS/*GLUTAMATE FAMILY|NITROGEN ASSIMILATION*

Q72Q39 UP -8500.1 LARGE REPLICON (2748518 2747748) (774 bp / 258 aa) pyrroline-5-carboxylate reductase (proC)

P61524 DOWN -32430.1 LARGE REPLICON (4079853 4081061) (1212 bp / 404 aa) Argininosuccinate synthase (citrulline-aspartate ligase) (argG)

II.A.2. BIOSYNTHESIS OF SMALL MOLECULES/AMINO ACIDS BIOSYNTHESIS/*ASPARTATE FAMILY, PYRUVATE FAMILY*

Q72RL9 UP -15040.1 LARGE REPLICON (2100758 2102341) (1587 bp / 529 aa) 2-isopropylmalate synthase (leuA)

II.A.3. BIOSYNTHESIS OF SMALL MOLECULES/AMINO ACIDS BIOSYNTHESIS/*GLYCINE-SERINE FAMILY|SULFUR METABOLISM*

Q72R94 DOWN -37580.1 LARGE REPLICON (2249435 2250049) (618 bp / 206 aa) putative methyltransferase

II.A.4. BIOSYNTHESIS OF SMALL MOLECULES/AMINO ACIDS BIOSYNTHESIS/*AROMATIC AMINO ACID FAMILY*

Q72NP6 DOWN -12680.1 LARGE REPLICON (3392714 3391959) (759 bp / 253 aa) indole-3-glycerol phosphate synthase (trpC)

II.B.1. BIOSYNTHESIS OF SMALL MOLECULES/NUCLEOTIDES BIOSYNTHESIS/*PURINE RIBONUCLEOTIDES*

Q72M65 UP -87980.1 LARGE REPLICON (4081553 4081963) (414 bp / 138 aa) nucleoside diphosphate kinase (ndk)

Q72QT3 DOWN -6490.1 LARGE REPLICON (2443536 2444387) (855 bp / 285 aa) methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (folD)

Q72R32 DOWN -37040.1 LARGE REPLICON (2317671 2316148) (1527 bp / 509 aa) IMP dehydrogenase (guaB)

Q72Q22 DOWN -8620.1 LARGE REPLICON (2765356 2765841) (489 bp / 163 aa) phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit protein (purE)

Q72UH8 DOWN -5240.1 LARGE REPLICON (823415 824269) (858 bp / 286 aa) phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase (purC)

Q72LV5 DOWN -33370.1 LARGE REPLICON (4215019 4215567) (552 bp / 184 aa) Hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase (hpt)

Q72RT4 DOWN -15620.1 LARGE REPLICON (2022353 2021730) (627 bp / 209 aa) phosphoribosylglycinamide formyltransferase (purN)

II.B.5. BIOSYNTHESIS OF SMALL MOLECULES/NUCLEOTIDES BIOSYNTHESIS/*OTHER*

Q72PQ1 UP -9920.1 LARGE REPLICON (2932331 2930865) (1470 bp / 490 aa) gtp-binding protein

II.D.4. BIOSYNTHESIS OF SMALL MOLECULES/COFACTORS, PROSTHETIC GROUPS, CARRIERS BIOSYNTHESIS/*MOLYBDOPTERIN*

Q72ND3 DOWN -13460.1 LARGE REPLICON (3515383 3520230) (4851 bp / 1617 aa) molybdate metabolism regulator (molR)

Q72S41 DOWN -16490.1 LARGE REPLICON (1907249 1908667) (1422 bp / 474 aa) RNA polymerase sigma-54 factor (rpoN)

Q72N99 DOWN -83760.1 LARGE REPLICON (3567911 3568240) (333 bp / 111 aa) anti-sigma factor antagonist

Q75FR6 DOWN -110.1 SMALL REPLICON (138122 137604) (522 bp / 174 aa) RNA polymerase ECF-type sigma factor

II.E. BIOSYNTHESIS OF SMALL MOLECULES/FATTY ACID AND PHOSPHATIDIC ACID BIOSYNTHESIS

Q72PH6	DOWN	-10510.1	LARGE REPLICON	(3021986 3021216)	(774 bp / 258 aa)	3-hydroxybutyryl-coa dehydratase (crt)
Q72PZ5	DOWN	-8870.1	LARGE REPLICON	(2798776 2798009)	(771 bp / 257 aa)	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase (fabG)
Q72SR4	DOWN	-18300.1	LARGE REPLICON	(1618309 1619463)	(1158 bp / 386 aa)	acetyl-CoA C-acyltransferase (erg10)

II.G. BIOSYNTHESIS OF SMALL MOLECULES/OTHER

Q72PY7	DOWN	-8940.1	LARGE REPLICON	(2812347 2811892)	(459 bp / 153 aa)	possible Lactoylglutathione lyase
Q72TR2	DOWN	-980.1	LARGE REPLICON	(1153776 1151788)	(1992 bp / 664 aa)	GcpE protein 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase (gcpE)

III.A.1. MACROMOLECULE METABOLISM/DNA METABOLISM/*REPLICATION*

Q72US1	UP	-4560.1	LARGE REPLICON	(714315 711565)	(2754 bp / 918 aa)	DNA polymerase I (polA)
Q72QK4	DOWN	-7120.1	LARGE REPLICON	(2552735 2551410)	(1329 bp / 443 aa)	replicative dna helicase (DnaB)
Q72MA6	DOWN	-32110.1	LARGE REPLICON	(4027044 4025002)	(2046 bp / 682 aa)	NAD dependent DNA ligase (lig)

III.A.5. MACROMOLECULE METABOLISM/DNA METABOLISM/*RESTRICTION, MODIFICATION*

Q72TT6	DOWN	-1180.1	LARGE REPLICON	(1123578 1122400)	(1182 bp / 394 aa)	type I restriction enzyme
Q72TT8	DOWN	-1200.1	LARGE REPLICON	(1121231 1118136)	(3099 bp / 1033 aa)	type I restriction enzyme

III.B.2. MACROMOLECULE METABOLISM/RNA METABOLISM/RIBOSOMAL PROTEINS

Q72NI6	UP	-82800.1	LARGE REPLICON	(3457571 3457164)	(411 bp / 137 aa)	30S ribosomal protein S11 (rpsK or rps11)
Q72NQ4	UP	-82000.1	LARGE REPLICON	(3381550 3381239)	(315 bp / 105 aa)	50S ribosomal protein L21 (rplU)
Q72NI9	DOWN	-13100.1	LARGE REPLICON	(3455524 3455012)	(516 bp / 172 aa)	50S ribosomal protein L17 (rplQ or rpl17)
Q72S27	DOWN	-67290.1	LARGE REPLICON	(1920964 1921377)	(417 bp / 139 aa)	50S ribosomal protein L19 (rplS)
Q72NI7	DOWN	-13120.1	LARGE REPLICON	(3457149 3456529)	(624 bp / 208 aa)	30S ribosomal protein S4 (rpsD or rps4)
Q72NI5	DOWN	-82820.1	LARGE REPLICON	(3457951 3457577)	(378 bp / 126 aa)	30S ribosomal protein S13 (rpsM)
Q72NH2	DOWN	-82940.1	LARGE REPLICON	(3463999 3463643)	(360 bp / 120 aa)	50S ribosomal protein L24 (rplX or rpl24)

Q72UA9	DOWN	-58100.1	LARGE REPLICON	(911590 911970)	(384 bp / 128 aa)	50s ribosomal protein L7/L12	(rplL)
Q72P39	DOWN	-80460.1	LARGE REPLICON	(3196476 3196676)	(204 bp / 68 aa)	50S ribosomal protein L31	(rpmE or rpl31)
Q72NH7	DOWN	-82890.1	LARGE REPLICON	(3461892 3461527)	(369 bp / 123 aa)	50S ribosomal protein L18	(rplR)
Q72NG6	DOWN	-83000.1	LARGE REPLICON	(3466411 3466082)	(333 bp / 111 aa)	50S ribosomal protein L22	(rplV)

III.B.4. MACROMOLECULE METABOLISM/RNA METABOLISM/*AMINOACYL TRNA SYNTHETASES, TRNA MODIFICATION*

P62371	DOWN	-34190.1	LARGE REPLICON	(59239 57923)	(1320 bp / 440 aa)	histidyl-tRNA synthetase	(hisS)
Q72Q44	DOWN	-8470.1	LARGE REPLICON	(2743242 2742145)	(1101 bp / 367 aa)	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)- methyltransferase	(trmU)
Q72PK6	DOWN	-10270.1	LARGE REPLICON	(2983569 2981656)	(1917 bp / 639 aa)	threonyl-tRNA synthetase	(thrS)

III.B.5. MACROMOLECULE METABOLISM/RNA METABOLISM/*RNA SYNTHESIS, MODIFICATION, DNA TRANSCRIPTION*

Q72TF6	UP	-20170.1	LARGE REPLICON	(1315186 1316535)	(1353 bp / 451 aa)	polynucleotide adenylyltransferase or poly A polymerase	(pcnB)
--------	----	----------	----------------	-------------------	--------------------	---	--------

III.B.7. MACROMOLECULE METABOLISM/RNA METABOLISM/*OTHER*

Q72V28	DOWN	-55120.1	LARGE REPLICON	(550621 550364)	(261 bp / 87 aa)	RNA-binding protein	
Q72SG5	DOWN	-17530.1	LARGE REPLICON	(1743955 1745214)	(1263 bp / 421 aa)	ATP-dependent protease (ATP-binding specificity subunit)	(clpX)

III.C.1. MACROMOLECULE METABOLISM/PROTEIN METABOLISM/*TRANSLATION AND MODIFICATION*

Q72W38	DOWN	-34610.1	LARGE REPLICON	(122769 121708)	(1065 bp / 355 aa)	peptide chain release factor 1 (RF-1)	(prfA)
Q72U13	DOWN	-30300.1	LARGE REPLICON	(1027396 1027992)	(600 bp / 200 aa)	elongation factor Ts (EF-Ts)	(tsf)
Q72T46	DOWN	-19280.1	LARGE REPLICON	(1445909 1444818)	(1095 bp / 365 aa)	translation initiation factor (IF-2B)	(eif)

III.C.2. MACROMOLECULE METABOLISM/PROTEIN METABOLISM/*CHAPERONES*

P61440	UP	-4090.1	LARGE REPLICON	(631558 630443)	(1119 bp / 373 aa)	molecular chaperone DnaJ	(dnaJ)
--------	----	---------	----------------	-----------------	--------------------	--------------------------	--------

III.C.3. MACROMOLECULE METABOLISM/PROTEIN METABOLISM/*PROTEIN DEGRADATION*

Q72UP9	UP	-4730.1	LARGE REPLICON	(746226 743710)	(2520 bp / 840 aa)	ATP-dependent protease La	(lon)
Q72LT5	UP	-33520.1	LARGE REPLICON	(4240049 4238457)	(1596 bp / 532 aa)	carboxypeptidase I	

Q72RY7 DOWN -16080.1 LARGE REPLICON (1960079 1961515) (1440 bp / 480 aa) ATP-dependent hsl protease (ATP-binding subunit) (hslU)

IV.A.1. CELL STRUCTURE/MEMBRANE COMPONENTS/*TRANSMEMBRANE OUTER MEMBRANE PROTEINS*

Q72W18 UP -34770.1 LARGE REPLICON (144198 145187) (993 bp / 331 aa) LipL45 homologue

Q72W26 UP -34700.1 LARGE REPLICON (132061 133272) (1215 bp / 405 aa) cytoplasmic membrane protein, conserved hypothetical

IV.A.2. CELL STRUCTURE/MEMBRANE COMPONENTS/PROBABLE LIPOPROTEINS

Q72RB4 UP -27820.1 LARGE REPLICON (2230887 2229961) (930 bp / 310 aa) Lipoprotein, probable

Q72UE4 DOWN -5480.1 LARGE REPLICON (862261 860942) (1323 bp / 441 aa) Lipoprotein, probable

IV.A.3. CELL STRUCTURE/MEMBRANE COMPONENTS/POSSIBLE LIPOPROTEINS

Q72T99 UP -19720.1 LARGE REPLICON (1386042 1386647) (609 bp / 203 aa) Lipoprotein, possible

IV.A.4. CELL STRUCTURE/MEMBRANE COMPONENTS/*TRANSMEMBRANE CYTOPLASMIC MEMBRANE PROTEINS*

Q72UE6 UP -5460.1 LARGE REPLICON (859399 858188) (1215 bp / 405 aa) Cytoplasmic membrane protein

Q72R89 DOWN -37530.1 LARGE REPLICON (2254093 2254845) (756 bp / 252 aa) cytoplasmic membrane protein, conserved hypothetical with mce protein

IV.B. CELL STRUCTURE/MUREIN SACCULUS, PEPTIDOGLYCAN

Q72S57 DOWN -16640.1 LARGE REPLICON (1892449 1891460) (993 bp / 331 aa) penicillin tolerance protein (lytB)

Q72RD8 DOWN -70020.1 LARGE REPLICON (2201469 2201717) (252 bp / 84 aa) Bola-like protein (bolA)

IV.C. CELL STRUCTURE/SURFACE POLYSACCHARIDES, LIPOPOLYSACCHARIDES, AND ANTIGENS

Q72RH9 UP -27270.1 LARGE REPLICON (2157671 2159272) (1605 bp / 535 aa) phosphomannomutase (manB)

Q72QE0 UP -7660.1 LARGE REPLICON (2626544 2625384) (1164 bp / 388aa) putative UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase

Q72S48 UP -16560.1 LARGE REPLICON (1900380 1901390) (1014 bp / 338 aa) ADP-heptose synthase (rfaE2)

Q72uh9 DOWN -32940.1 LARGE REPLICON (4157330 4155711) (1623 bp / 541 aa) polysaccharide deacetylase

IV.D. CELL STRUCTURE/SURFACE STRUCTURES

Q72QW8 DOWN -6220.1 LARGE REPLICON (2396550 2400146) (3600 bp / 1200 aa) cytoplasmic membrane protein with TPR and novel repeat domains

V.A.1. CELLULAR PROCESSES/TRANSPORT/AMINO ACIDS, AMINES

Q72UM6 UP -4880.1 LARGE REPLICON (770554 771318) (768 bp / 256 aa) ABC transporter ATP-binding protein (lin)

V.A.3. CELLULAR PROCESSES/TRANSPORT/*CARBOHYDRATES, ORGANIC ACIDS, ALCOHOLS*

Q72N82 UP -13880.1 LARGE REPLICON (3588362 3587898) (468 bp / 156 aa) nitrogen regulatory IIA protein (ptsN)

V.A.4. CELLULAR PROCESSES/TRANSPORT/*CATIONS*

Q75FH2 UP -211.1 SMALL REPLICON (277821 278222) (405bp / 135 aa) ExbD (exbD)

V.A.6. CELLULAR PROCESSES/TRANSPORT/*PROTEIN, PEPTIDE SECRETION*

Q72PD1 UP -78010.1 LARGE REPLICON (3079717 3079394) (327 bp / 109 aa) preprotein translocase YajC subunit (YajC)

Q72PD3 DOWN -10800.1 LARGE REPLICON (3078637 3076712) (1929 bp / 643 aa) protein-export membrane protein secD subunit (secD)

V.A.7. CELLULAR PROCESSES/TRANSPORT/*OTHER*

Q72VE7 UP -2780.1 LARGE REPLICON (397010 397921) (915bp / 305 aa) ABC transporter ATP-binding protein (nosF)

Q72VR3 DOWN -2030.1 LARGE REPLICON (268725 269399) (678bp / 226 aa) ABC transporter ATP-binding protein (lolD)

V.C. CELLULAR PROCESSES/CHEMOTAXIS AND MOBILITY

Q72SK4 UP -17840.1 LARGE REPLICON (1694979 1696262) (1287 bp / 429 aa) flagellar GTP-binding protein (flhF)

Q72ML0 UP -86430.1 LARGE REPLICON (3895057 3894677) (384 bp / 128 aa) methyl-accepting chemotaxis-like

Q72U75 UP -5960.1 LARGE REPLICON (954316 955032) (720bp / 240 aa) flagellar filament sheath protein (flaA-2)

VII.C. PATHOGENICITY, VIRULENCE, AND ADAPTATION/TOXIN PRODUCTION AND DETOXIFICATION

Q72P28 UP -11630.1 LARGE REPLICON (3211033 3210467) (570 bp / 190 aa) glutathione peroxidase (btuE)

Q72SR5 UP -18310.1 LARGE REPLICON (1618270 1617737) (537 bp / 179 aa) bacterioferritin (bfr)

Q72NR4 DOWN -12560.1 LARGE REPLICON (3371458 3371970) (516 bp / 172 aa) thiol peroxidase (tpx)

VIII.A. HYPOTHETICAL/CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEINS

Q72N16	UP	-14410.1	LARGE REPLICON	(3683396 3684568)	(1176 bp / 392 aa)	conserved hypothetical protein
Q72VH0	UP	-2630.1	LARGE REPLICON	(372539 373330)	(795bp / 265 aa)	conserved hypothetical protein
Q72LX7	UP	-33160.1	LARGE REPLICON	(4191341 4192306)	(969 bp / 323 aa)	conserved hypothetical protein
Q72MJ5	UP	-33440.1	LARGE REPLICON	(4226070 4225621)	(453 bp / 151 aa)	conserved hypothetical protein
P62038	UP	-13330.1	LARGE REPLICON	(3489390 3488644)	(750 bp / 250 aa)	conserved hypothetical protein
Q72W73	UP	-34340.1	LARGE REPLICON	(84280 83801)	(483bp / 161 aa)	conserved hypothetical protein
Q72QB9	UP	-7830.1	LARGE REPLICON	(2646256 2645465)	(795 bp / 265 aa)	conserved hypothetical protein
Q72R04	UP	-29170.1	LARGE REPLICON	(2357917 2357363)	(558 bp / 186 aa)	conserved hypothetical protein
Q72MX4	UP	-28020.1	LARGE REPLICON	(3742034 3741024)	(1014 bp / 338 aa)	conserved hypothetical protein
Q72RK8	UP	-27050.1	LARGE REPLICON	(2116522 2115728)	(798 bp / 266 aa)	conserved hypothetical protein
Q72UY2	UP	-4070.1	LARGE REPLICON	(629162 628617)	(549bp / 183 aa)	conserved hypothetical protein
Q72QE8	UP	-7580.1	LARGE REPLICON	(2616044 2615184)	(864 bp / 288 aa)	conserved hypothetical protein
Q72TY7	UP	-59440.1	LARGE REPLICON	(1061303 1061788)	(489 bp / 163 aa)	conserved hypothetical protein
Q72UD9	UP	-5520.1	LARGE REPLICON	(873616 872174)	(1446 bp / 482 aa)	conserved hypothetical protein
Q72RD5	UP	-27610.1	LARGE REPLICON	(2203307 2202279)	(1032 bp / 344 aa)	conserved hypothetical protein
Q72RK6	DOWN	-27070.1	LARGE REPLICON	(2124672 2118871)	(5805 bp / 1935 aa)	conserved hypothetical protein
Q72RJ5	DOWN	-27150.1	LARGE REPLICON	(2137283 2137927)	(648 bp / 216 aa)	conserved hypothetical protein
Q72VD4	DOWN	-2890.1	LARGE REPLICON	(411359 412051)	(696bp / 232 aa)	conserved hypothetical protein
Q72QY6	DOWN	-6090.1	LARGE REPLICON	(2376430 2376999)	(573 bp / 191 aa)	conserved hypothetical protein
Q72WB7	DOWN	-33930.1	LARGE REPLICON	(23118 23723)	(609bp / 203 aa)	conserved hypothetical protein
Q72PL2	DOWN	-77110.1	LARGE REPLICON	(2978184 2977846)	(342 bp / 114 aa)	conserved hypothetical protein
Q72TC5	DOWN	-61930.1	LARGE REPLICON	(1352638 1352327)	(315 bp / 105 aa)	conserved hypothetical protein
Q75FH5	DOWN	-208.1	SMALL REPLICON	(273993 276521)	(2532 bp / 844 aa)	conserved hypothetical protein
Q72RG9	DOWN	-27350.1	LARGE REPLICON	(2168308 2167565)	(747 bp / 249 aa)	conserved hypothetical protein

Q72M30	DOWN	-32720.1	LARGE REPLICON	(4122194 4120110)	(2088 bp / 696 aa)	conserved hypothetical protein
Q72QF6	DOWN	-7520.1	LARGE REPLICON	(2607837 2606812)	(1029 bp / 343 aa)	conserved hypothetical protein
Q72SP3	DOWN	-18120.1	LARGE REPLICON	(1646881 1646213)	(672 bp / 224 aa)	conserved hypothetical protein
Q75G10	DOWN	-3.1	SMALL REPLICON	(4888 4067)	(825bp / 275 aa)	conserved hypothetical protein
Q72UM5	DOWN	-4890.1	LARGE REPLICON	(771302 772522)	(1224 bp / 408 aa)	conserved hypothetical protein
Q72QW4	DOWN	-71990.1	LARGE REPLICON	(2403973 2404416)	(447 bp / 149 aa)	conserved hypothetical protein
Q72ST9	DOWN	-64040.1	LARGE REPLICON	(1585024 1584665)	(363 bp / 121 aa)	conserved hypothetical protein
Q72TF9	DOWN	-20200.1	LARGE REPLICON	(1311361 1311981)	(624 bp / 208 aa)	conserved hypothetical protein
Q72NZ6	DOWN	-80950.1	LARGE REPLICON	(3250392 3250709)	(321 bp / 107 aa)	conserved hypothetical protein
Q72NX1	DOWN	-12120.1	LARGE REPLICON	(3294634 3294149)	(489 bp / 163 aa)	conserved hypothetical protein
Q72M31	DOWN	-32710.1	LARGE REPLICON	(4120105 4118273)	(1836 bp / 612 aa)	conserved hypothetical protein

VIII.B. HYPOTHETICAL/HYPOTHETICAL PROTEINS (INCLUDES NO HITS OR ONLY LOW SCORE HITS)

Q72P76	UP	-11280.1	LARGE REPLICON	(3152985 3152257)	(732 bp / 244 aa)	hypothetical protein
Q72VR5	UP	-2010.1	LARGE REPLICON	(267223 266213)	(1014 bp / 338 aa)	hypothetical protein
Q75FR8	UP	-108.1	SMALL REPLICON	(136425 135877)	(552bp / 184 aa)	hypothetical protein
Q72MP9	UP	-26510.1	LARGE REPLICON	(3856793 3854211)	(2586 bp / 862 aa)	hypothetical protein
Q72PQ4	UP	-76610.1	LARGE REPLICON	(2929351 2929142)	(213 bp / 71 aa)	hypothetical protein
Q72VH9	UP	-2560.1	LARGE REPLICON	(361750 363669)	(1923 bp / 641 aa)	hypothetical protein
Q72V21	UP	-3710.1	LARGE REPLICON	(559027 559605)	(582bp / 194 aa)	hypothetical protein
Q72P95	UP	-79860.1	LARGE REPLICON	(3128806 3129009)	(207 bp / 69 aa)	hypothetical protein
Q72RM9	UP	-15130.1	LARGE REPLICON	(2088107 2087061)	(1050 bp / 350 aa)	hypothetical protein
Q72PA6	UP	-11030.1	LARGE REPLICON	(3114624 3113791)	(837 bp / 279 aa)	hypothetical protein
Q72N94	UP	-83810.1	LARGE REPLICON	(3572740 3572075)	(669 bp / 223 aa)	hypothetical protein
Q72R02	UP	-71510.1	LARGE REPLICON	(2359318 2358965)	(357 bp / 119 aa)	hypothetical protein
Q72P62	UP	-80210.1	LARGE REPLICON	(3163067 3162660)	(411 bp / 137 aa)	hypothetical protein
Q72SQ5	UP	-18230.1	LARGE REPLICON	(1630612 1629599)	(1017 bp / 339 aa)	hypothetical protein
Q72V52	UP	-3500.1	LARGE REPLICON	(513874 514662)	(792bp / 264 aa)	hypothetical protein

Q72RR3	DOWN	-15410.1	LARGE REPLICON	(2042711 2043211)	(504 bp / 168 aa)	hypothetical protein
Q75FC4	DOWN	-264.1	SMALL REPLICON	(343490 343107)	(387bp / 129 aa)	hypothetical protein
Q72TK9	DOWN	-60970.1	LARGE REPLICON	(1228682 1227936)	(750 bp / 250 aa)	hypothetical protein
Q72S85	DOWN	-66650.1	LARGE REPLICON	(1850464 1850703)	(243 bp / 81 aa)	hypothetical protein
Q75FF3	DOWN	-234.1	SMALL REPLICON	(304144 303605)	(543bp / 181 aa)	hypothetical protein
Q72V86	DOWN	-54420.1	LARGE REPLICON	(474495 473980)	(519bp / 173 aa)	hypothetical protein
Q75FI8	DOWN	-190.1	SMALL REPLICON	(249924 250439)	(519bp / 173 aa)	hypothetical protein
Q72S36	DOWN	-16450.1	LARGE REPLICON	(1913026 1913874)	(852 bp / 284 aa)	hypothetical protein
Q72UZ1	DOWN	-4020.1	LARGE REPLICON	(615803 616639)	(840bp / 280 aa)	hypothetical protein
Q72TD0	DOWN	-19960.1	LARGE REPLICON	(1346917 1346435)	(486 bp / 162 aa)	hypothetical protein
Q72T59	DOWN	-19370.1	LARGE REPLICON	(1433123 1433653)	(534 bp / 178 aa)	hypothetical protein
Q72PB1	DOWN	-78220.1	LARGE REPLICON	(3103359 3104306)	(951 bp / 317 aa)	hypothetical protein
Q75FG6	DOWN	-217.1	SMALL REPLICON	(284151 284579)	(432bp / 144 aa)	hypothetical protein
Q72MV6	DOWN	-26030.1	LARGE REPLICON	(3769566 3768922)	(648 bp / 216 aa)	hypothetical protein
Q72U95	DOWN	-58250.1	LARGE REPLICON	(932299 931868)	(435bp / 145 aa)	hypothetical protein
Q72LT6	DOWN	-89390.1	LARGE REPLICON	(4238473 4238126)	(351 bp / 117 aa)	hypothetical protein
Q72P99	DOWN	-11120.1	LARGE REPLICON	(3124394 3125824)	(1434 bp / 478 aa)	hypothetical protein

VIII.C. HYPOTHETICAL/HYPOTHETICAL WITH INTERNAL REPEATS

Q72NQ2	UP	-12630.1	LARGE REPLICON	(3384846 3383989)	(861 bp / 287 aa)	conserved hypothetical protein
Q72QA5	UP	-7960.1	LARGE REPLICON	(2662267 2662836)	(573 bp / 191 aa)	conserved hypothetical
Q72SX6	DOWN	-18750.1	LARGE REPLICON	(1536340 1539642)	(3306 bp / 1102 aa)	glutamate-rich repeat protein

IX. ORFS WITH UNDEFINED CATEGORY

Q72SD2	UP	-17245.1	LARGE REPLICON	(1790140 1789379)	(765 bp / 255 aa)	exodeoxyribonuclease
Q72S33	UP	-16420.1	LARGE REPLICON	(1916888 1917880)	(996 bp / 332 aa)	serine/threonine kinase