DANIELLY GONÇALVES WOLFF

**Caracterização do fator de alongação Tu (EF-Tu) de
Leptospira: aspectos relacionados à colonização e evasão
ao sistema complemento do hospedeiro**

São Paulo

2013

DANIELLY GONÇALVES WOLFF

Caracterização do fator de alongação Tu (EF-Tu) de *Leptospira*: aspectos relacionados à colonização e evasão ao sistema complemento do hospedeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - VPS

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Angela Silva Barbosa

De acordo: _____
Orientador(a)

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2845
FMVZ

Wolff, Danielly Gonçalves

Caracterização do fator de alongação Tu (EF-Tu) de *Leptospira*: aspectos relacionados à colonização e evasão ao sistema complemento do hospedeiro / Danielly Gonçalves Wolff. -- 2013.

107 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Angela Silva Barbosa.

1. Leptospira. 2. Fator de alongação Tu. 3. Evasão imune. 4. Plasminogênio. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização do fator de alongação Tu (EF-Tu) de Leptospira: aspectos relacionados à colonização e evasão ao sistema complemento do hospedeiro", protocolado sob o nº 2385/2011, utilizando 10 (dez) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Angela Silva Barbosa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Characterization of elongation factor Tu (EF-Tu) of Leptospira: aspects related to colonization and evasion of the host complement system", protocol number 2385/2011, utilizing 10 (ten) mice, under the responsibility Profa. Dra. Angela Silva Barbosa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 18 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: WOLFF, Danielly Gonçalves

Título: Caracterização do fator de alongação Tu (EF-Tu) de *Leptospira*: aspectos relacionados à colonização e evasão ao sistema complemento do hospedeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data:___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico a Deus e aos meus pais Dirceu e Elaine Wolff, por
tudo que fizeram por mim.*

AGRADECIMENTOS

*Em primeiro lugar agradeço a **Deus** pela capacitação e sabedoria que me concedeu, permitindo a realização desse trabalho bem como o conhecimento adquirido nesse período.*

*Meus sinceros agradecimentos à minha querida família. Meus amados pais **Dirceu e Elaine**, por todo suor e lágrimas derramadas que agora são convertidos sorrisos em comemoração pela vitória alcançada, foi difícil e sofrido, mas a recompensa é certa quando se luta ao lado de quem amamos. Às minhas irmãs **Cris e Jully**, por aguentarem meu estresse em casa e suportarem todo esse tempo sempre me apoiando e ajudando a crescer, vocês são essenciais em minha vida. Aos meus **avós, tios e primos** pelas orações e torcida constantes. Família a gente não escolhe, mas se pudesse escolheria vocês, com todas as qualidades e defeitos, pois amo a cada um. Com certeza vocês tornaram possível a realização desse sonho. Amo muito vocês. Obrigada de coração!*

*Um agradecimento especial à minha orientadora **Dra. Ângela Silva Barbosa**, pela oportunidade a mim concedida, pela paciência, dedicação, pelos conselhos e por tantos ensinamentos, por ser mestre nas lições profissionais e de vida. Muito obrigada!*

*À **Dra. Patrícia A. E. Abreu de Aniz**, pelo apoio e pelas lições ensinadas.*

*À **profª Cecília Abe**, pela colaboração e por ser tão prestativa e carinhosa comigo, obrigada de coração!*

*Ao amigo **Renan Lima de Araújo** pela indicação e pelo apoio de sempre. Obrigada pela sua amizade e por tudo que fez por mim! Você é muito especial pra mim e com certeza responsável por parte desse trabalho! Obrigada!*

*Aos meus queridos amigos da **Igreja do Jundiá em Anápolis-GO**, obrigada pelas orações e pela torcida, vocês são parte essencial da minha vida! Amo vocês!*

*Aos meus amigos do **Coral Universitário Expressão Jovem**, obrigada pelo carinho, apoio, torcida e pelas orações constantes, com certeza Deus usou vocês pra me fortalecerem durante esse projeto. Agradeço em especial à **Polly, Kelly, Dani Fellao, Juninho (W.J), Guidi, Greice e Nelson (Irmão)**, o apoio e incentivo de vocês foram fundamentais na conclusão desse trabalho. Amo todos vocês, muito obrigada!*

*Às meninas companheiras de laboratório, **Ludy, Lígia, Denise, Demétria, Taty, Vanessa, Lídia, Larissa, Amane e Matilde**, obrigada pelo incentivo, apoio e compreensão. Vocês são muito especiais!*

*Aos **pesquisadores do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan**. Obrigada pela colaboração e por compartilhar um pouco de seus conhecimentos.*

*Aos **funcionários do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.** Agradeço pela dedicação ao realizar seus trabalhos e pela convivência durante esses anos. Obrigada!*

*Aos queridos do **Laboratório de Sistema Complemento da USP.** Á **Prof. Dra. Lourdes Isaac**, obrigada pela colaboração e por abrir as portas do laboratório pra me receber sempre que preciso. **Tati Fraga**, obrigada por ser tão querida e atenciosa comigo, seus conselhos, consolos e conversas foram fundamentais durante todo esse tempo, você se tornou muito especial pra mim e com certeza vou sentir saudades de você, obrigada mesmo! **Mónica Castiblanco**, obrigada pela paciência e por me ajudar tanto, obrigada por ser tão prestativa, sem você teria sido muito mais difícil. **Dri, Dani, Leandro** e **profª Marlene** obrigada por sempre me receberem tão bem e me ajudarem sempre que preciso!*

*Ao **Prof. Dr. Silvio Vasconcellos, Zenaide** e **Gisele** do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, pela colaboração.*

*À **CAPESP** e a **FAPESP** pelo apoio financeiro.*

*Habilidade é o que você é capaz de fazer. Motivação determina o que você faz.
Atitude determina o quanto você faz isso bem feito!*

Lou Holtz

“Tudo posso naquEle que me fortalece!”

(Filipenses 4:13)

RESUMO

WOLFF, D. G. **Caracterização do fator de alongação Tu (EF-Tu) de *Leptospira*: aspectos relacionados à colonização e evasão ao sistema complemento do hospedeiro.** [Characterization of elongation factor Tu (EF-Tu) *Leptospira*: aspects related to colonization and evasion of the host complement system]. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. A doença representa um grave problema de saúde pública nos países tropicais subdesenvolvidos. Mais de 500.000 casos graves de leptospirose são notificados a cada ano e a taxa de mortalidade excede 10% (World Health Organization, 1999). Os roedores são o principal reservatório urbano da doença, e eliminam leptospirosas viáveis no meio ambiente ao longo de toda a vida. As bactérias entram no hospedeiro por abrasões na pele ou por membranas mucosas e rapidamente se espalham pelo organismo atingindo vários órgãos. A identificação de mecanismos de invasão e de evasão imune apresentados por leptospirosas patogênicas é extremamente relevante e tem sido alvo de pesquisas recentes desenvolvidas por vários grupos. Nesse contexto, a caracterização funcional de proteínas de membrana externa de *Leptospira*, principais alvos de interação com moléculas do hospedeiro, é de grande importância. O Fator de Elongação Tu (EF-Tu), uma proteína bacteriana abundante envolvida na síntese protéica, pertence à categoria das proteínas conhecidas como “moonlighting”. Tais moléculas possuem a capacidade de exercer mais de uma função e, normalmente, localizam-se em diferentes compartimentos da célula. Há relatos de que EF-Tu de agentes patogênicos possa atuar como um fator de virulência. No presente trabalho, demonstrou-se que EF-Tu de *Leptospira* está localizado na superfície da bactéria e possui funções adicionais, sendo receptor para moléculas presentes no plasma do hospedeiro. Tal proteína interage com vários componentes da matriz extracelular e também com plasminogênio, de maneira dose-dependente. Resíduos de lisina são importantes para essa interação. Plasminogênio ligado a EF-Tu é convertido em sua forma ativa, plasmina, que, por sua vez, é capaz de clivar os substratos naturais C3b e fibrinogênio. EF-Tu de *Leptospira* também se liga a Fator H, principal regulador da via alternativa do sistema complemento, e este mantém sua atividade funcional ao agir como co-fator de Fator I na clivagem de C3b.

O potencial imunoprotetor de EF-Tu em modelo animal foi avaliado, tendo em vista o alto grau de conservação da proteína em diferentes espécies de *Leptospira*. EF-Tu não conferiu proteção significativa e, portanto, não deve ser considerado como um candidato vacinal contra a leptospirose. Em suma, EF-Tu de *Leptospira* deve contribuir para o processo de invasão e evasão ao sistema imune inato do hospedeiro, inativando o sistema complemento. Tanto quanto é do nosso conhecimento, essa é a primeira descrição de uma proteína “moonlighting” em *Leptospira*.

Palavras-chave: *Leptospira*. Fator de Elongação Tu. Evasão imune. Plasminogênio.

ABSTRACT

WOLFF, D. G. **Characterization of elongation factor Tu (EF-Tu) *Leptospira*: aspects related to colonization and evasion of the host complement system.** [Caracterização do fator de elongação Tu (EF-Tu) de *Leptospira*: aspectos relacionados à colonização e evasão ao sistema complemento do hospedeiro]. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Leptospirosis is a zoonosis caused by pathogenic bacteria from the genus *Leptospira*. The disease represents a serious public health problem in underdeveloped tropical countries. More than 500,000 cases of severe leptospirosis are reported each year, with mortality rates exceeding 10% (World Health Organization, 1999). Rodents are the main urban reservoir of the disease, shedding viable leptospires throughout their lives in the environment. Leptospires infect hosts through small abrasions in the skin or mucous membranes and they rapidly disseminate to target organs. The identification of invasion mechanisms and immune evasion strategies employed by pathogenic leptospires is of great relevance. In this context, functional characterization of leptospiral outer membrane proteins, which represent the main targets for interaction with host molecules, is extremely important. The elongation factor Tu (EF-Tu), an abundant bacterial protein involved in protein synthesis, has been shown to display moonlighting activities. Known to perform more than one function at different times or in different places, it is found in several subcellular locations in a single organism, and may serve as a virulence factor in a range of important human pathogens. In this work we demonstrate that *Leptospira* EF-Tu is surface-exposed and performs additional roles as a cell-surface receptor for host plasma proteins. It interacts with several extracellular matrix components and also binds plasminogen in a dose-dependent manner. Lysine residues are critical for this interaction. Bound plasminogen is converted to active plasmin, which, in turn, is able to cleave the natural substrates C3b and fibrinogen. *Leptospira* EF-Tu also acquires Factor H (FH), the main soluble regulator of the alternative pathway of the complement system. FH bound to immobilized EF-Tu displays cofactor activity, mediating C3b degradation by Factor I (FI). Given the wide distribution of EF-Tu among *Leptospira* species, its immunoprotective potential was evaluated in an animal model. EF-Tu was not able to afford significant immunoprotection, and might not be considered a vaccine candidate.

against leptospirosis. In conclusion, EF-Tu may contribute to leptospiral tissue invasion and complement inactivation. To our knowledge, this is the first description of a leptospiral protein exhibiting moonlighting activities.

Key words: *Leptospira*. Elongation Factor Tu. Immune evasion. Plasminogen

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da evolução da leptospirose	23
Figura 2 - Imagem de <i>L. interrogans</i> sorovar Icterohaemorrhagiae	25
Figura 3 - Vetor pGEM-T easy	42
Figura 4 - Vetor pAE.....	43
Figura 5 - Amplificação do gene EF-Tu por PCR	61
Figura 6 - Seleção de construções plasmidiais positivas para o gene LIC12875 no vetor pGEM-T easy	62
Figura 7 - Análise dos plasmídeos pGEM-T contendo o inserto EF-Tu	63
Figura 8 - Seleção de construções plasmidiais positivas para o gene LIC12875 no vetor pAE	64
Figura 9 - Análise dos plasmídeos contendo o inserto EF-Tu	65
Figura 10 - Análise da expressão e purificação de EF-Tu expressa na fração solúvel	67
Figura 11 - Análise da purificação de EF-Tu expressa na fração solúvel.....	67
Figura 12 - Análise da purificação de EF-Tu expressa na fração insolúvel.....	68
Figura 13 - Análise da purificação de EF-Tu expressa na fração insolúvel.....	69
Figura 14 - Localização celular de EF-Tu em <i>Leptospira interrogans</i> por imunofluorescência de superfície	72
Figura 15 - Localização celular de EF-Tu por microscopia eletrônica	73
Figura 16 - Análise do papel dos resíduos de lisina na ligação EF-Tu/plasminogênio	80
Figura 17 - Papel de forças iônicas na ligação EF-Tu/plasminogênio.....	80

Figura 18 - Plasminogênio ligado a EF-Tu é convertido em sua forma ativa (plasmina).....	81
Figura 19 - Degradação de C3b pelo plasminogênio ativo (plasmina) ligado a EF-Tu	83
Figura 20 - Degradação de fibrinogênio humano pela plasmina ligada a EF-Tu	84
Figura 21 - Interação de EF-Tu com Fator H e C4BP por <i>western blot</i> com sobreposição	85
Figura 22 - Avaliação da atividade co-fatora de FH ligado a EF-Tu	87
Figura 23 - Análise da conservação de EF-Tu em diferentes espécies de <i>Leptospira</i> por <i>immunoblotting</i>	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Exemplos de proteínas <i>moonlighting</i> de animais e humanos e suas diferentes funções	28
Quadro 2 - Exemplos de proteínas <i>moonlighting</i> em plantas e procariotos	29
Quadro 3 - Descrição dos reagentes utilizados nos diferentes procedimentos.....	35
Quadro 4 - Descrição dos meios de cultura utilizados	38
Quadro 5 - Reação de amplificação do gene EF-Tu (PCR)	43
Quadro 6 - Condições da reação de PCR.....	43
Quadro 7 - Reação de ligação do fragmento gênico ao vetor de clonagem pGEM-T easy	45
Quadro 8 - Primers utilizados no sequenciamento dos fragmentos clonados no vetor pGEM-T easy	46
Quadro 9 - Reação de digestão com enzima de restrição <i>EcoRI</i>	47
Quadro 10 - Dosagem de proteínas recombinantes por curva de LMW com valores já conhecidos.....	52
Quadro 11 - Análise da eficácia protetora de EF-Tu em modelo animal (hamster)	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Determinação do título de anticorpos anti EF-Tu produzidos em camundongos.....	70
Gráfico 2 - Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com colágeno do tipo I	74
Gráfico 3 - Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com colágeno do tipo IV.....	75
Gráfico 4 - Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com elastina.....	75
Gráfico 5 - Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com laminina.....	76
Gráfico 6 - Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com fibronectina plasmática.....	77
Gráfico 7 - Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com fibronectina celular	77
Gráfico 8 - Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com fibrinogênio.....	78
Gráfico 9 - Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com plasminogênio	79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 A DOENÇA LEPTOSPIROSE	21
1.2 A BACTÉRIA LEPTOSPIRA.....	24
1.3 SISTEMA COMPLEMENTO E INFECÇÃO	26
1.4 PROTEÍNAS <i>MOONLIGHTING</i>	27
1.5 FATOR DE ELONGAÇÃO Tu (ELONGATION FACTOR Tu).....	31
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 REAGENTES E MEIOS DE CULTURA.....	35
3.1.1 Reagentes	35
3.1.2 Meios de cultura para bactérias.....	38
3.2 BACTÉRIAS	39
3.2.1 Cepas bacterianas.....	39
3.2.2 Preparo de bactérias competentes.....	39
3.2.3 Transformação bacteriana.....	40
3.2.3.1 Transformação de DH5 α	40
3.2.3.2 Transformação de BL21-SI	41
3.3 VETORES UTILIZADOS	41
3.3.1 pGEM-T easy.....	41
3.3.2 Pae.....	42
3.4 AMPLIFICAÇÃO DO GENE POR PCR	43
3.5 CLONAGEM DO GENE EF-Tu NO VETOR pGEM-T easy.....	44
3.5.1 Seleção de clones positivos pelo método fenol-clorofórmio.....	45

3.5.2 Mini-preparação de DNA plasmidial	46
3.5.3 Sequenciamento.....	46
3.5.4 Digestão com enzima de restrição.....	46
3.6 SUBCLONAGEM DO GENE NO VETOR DE EXPRESSÃO	47
3.7 EXPRESSÃO DE EF-Tu RECOMBINANTE.....	47
3.8 SDS-PAGE (ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA)	48
3.9 PURIFICAÇÃO.....	49
3.9.1 Preparação da coluna His Trap HP	49
3.9.2 Purificação de EF-Tu a partir do sobrenadante.....	49
3.9.3 Purificação de EF-Tu a partir do <i>pellet</i> bacteriano	50
3.9.4 Limpeza da coluna His Trap HP	50
3.9.5 Diálise.....	50
3.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA	50
3.10.1 Bradford	51
3.10.2 Gel com curva de LMW (Low Molecular Weight Protein Marker).....	51
3.11 ANTICORPOS.....	52
3.11.1 Produção de anticorpos anti EF-Tu em camundongos	52
3.11.2 Determinação dos títulos de anticorpos	53
3.12 SORO HUMANO NORMAL.....	53
3.13 PROTEÍNAS DO SISTEMA COMPLEMENTO, COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR, MOLÉCULAS DA CASCATA DE COAGULAÇÃO E ANTICORPOS	53
3.14 ENSAIOS DE LOCALIZAÇÃO CELULAR	54
3.14.1 Imunofluorescência.....	54
3.14.2 Microscopia eletrônica.....	54
3.15 ENSAIOS DE INTERAÇÃO DE EF-Tu COM COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR E MOLÉCULAS DA CASCATA DE COAGULAÇÃO POR ELISA	55

3.16 PAPEL DOS RESÍDUOS DE LISINA E DO NaCl NA INTERAÇÃO EF-Tu/PLASMINOGÊNIO	56
3.17 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO PLASMINOGÊNIO LIGADO A EF-Tu DE <i>LEPTOSPIRA</i> DE GERAR PLASMINA.....	56
3.18 CAPACIDADE DA PLASMINA GERADA SOBRE EF-Tu DE CLIVAR C3b.....	57
3.19 CAPACIDADE DA PLASMINA GERADA SOBRE EF-Tu DE CLIVAR FIBRINOGENO	58
3.20 ENSAIOS DE INTERAÇÃO DE EF-Tu COM REGULADORES DO SISTEMA COMPLEMENTO POR <i>WESTERN BLOT</i> COM SOBREPOSIÇÃO	58
3.21 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CO-FATOR DE FH E C4BP LIGADOS A EF-Tu	59
3.22 AVALIAÇÃO DA CONSERVAÇÃO DE EF-Tu EM DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>LEPTOSPIRA</i> (<i>IMMUNOBLOTTING</i>)	60
3.23 ENSAIO DE IMUNOPROTEÇÃO EM MODELO ANIMAL (HAMSTER)	60
4 RESULTADOS.....	61
4.1 CLONAGEM DO GENE QUE CODIFICA EF-Tu (LIC12875) NO VETOR pGEM-T easy	61
4.2 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES POSITIVOS.....	63
4.3 SUBCLONAGEM DO GENE QUE CODIFICA EF-Tu (LIC12875) NO VETOR DE EXPRESSÃO pAE	63
4.4 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES POSITIVOS.....	65
4.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE EF-Tu RECOMBINANTE	66
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA EF-Tu RECOMBINANTE	69
4.7 PRODUÇÃO DE ANTI EF-Tu EM CAMUNDONGOS	70
4.8 LOCALIZAÇÃO CELULAR DE EF-Tu EM <i>LEPTOSPIRA</i>	71
4.9 INTERAÇÃO DE EF-Tu COM COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR E MOLÉCULAS DA CASCATA DE COAGULAÇÃO	73

4.10 PAPEL DOS RESÍDUOS DE LISINA OU DE FORÇAS IÔNICAS NA LIGAÇÃO DE EF-Tu AO PLASMINOGÊNIO	79
4.11 PLASMINOGÊNIO LIGADO A EF-Tu É CONVERTIDO EM PLASMINA	81
4.12 PLASMINA GERADA SOBRE EF-Tu CLIVA C3b.....	82
4.13 PLASMINA GERADA SOBRE EF-Tu CLIVA FIBRINOGENO	83
4.14 INTERAÇÃO DE EF-Tu COM REGULADORES DO SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO	84
4.15 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CO-FATOR DE FH E C4BP LIGADOS A EF-Tu	86
4.16 CONSERVAÇÃO DE EF-Tu EM DIFERENTES SOROVARIES DE <i>LEPTOSPIRA</i>	88
4.17 ENSAIO DE IMUNOPROTEÇÃO EM MODELO ANIMAL (HAMSTER)	88
5 DISCUSSÃO	90
6 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS.....	99

INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma infecção causada por espécies patogênicas de bactérias do gênero *Leptospira*. Índices mais elevados de infecção ocorrem em épocas de chuva devido ao aumento das enchentes, favorecendo o crescimento, desenvolvimento e disseminação da bactéria (LEVETT, 2004; PALANIAPPAN et al., 2007; VIJAYACHARI; SUGUNAN; SHRIRAM, 2008; GUERRA, 2009).

A leptospirose é uma doença com ampla distribuição em todo o mundo e hoje considerada um problema de saúde pública em alguns países onde é endêmica. Sua incidência é mais elevada em regiões de clima tropical e subtropical, sendo comum em países subdesenvolvidos, apesar de apresentar, nos últimos anos, um aumento significativo em sua incidência em países desenvolvidos (VIJAYACHARI; SUGUNAN; SHRIRAM, 2008; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). Trata-se de uma doença difícil de se diagnosticar devido aos sintomas semelhantes aos de diversas outras enfermidades como gripe, dengue, malária, hepatite, entre outras. É também muitas vezes negligenciada, aumentando assim as chances de surtos e epidemias.

Diversas espécies de mamíferos podem servir de reservatório para leptospirosas e, conseqüentemente, se tornar excretoras dessa bactéria. Porém, o principal reservatório urbano e transmissor da doença para humanos é o rato (*Rattus norvegicus*), comumente encontrado nos bueiros de esgoto das grandes cidades ou em locais sem saneamento básico. Os animais são infectados pela bactéria, não apresentam sintomas clínicos e passam a portar as leptospirosas em seus túbulos renais excretando-as para o meio ambiente através da urina (FAINE et al., 1999; ABDULKADER; SILVA, 2008; VIJAYACHARI; SUGUNAN; SHRIRAM, 2008; GUERRA, 2009). Uma vez no meio ambiente, as leptospirosas podem sobreviver em lugares úmidos por longos períodos, desde que estes locais apresentem características propícias ao seu desenvolvimento, como temperaturas de 28-38°C e pH entre 6,2 e 8,0. A sobrevivência da bactéria na água pode ser inibida pela

contaminação com esgoto, acidez elevada e alta concentração salina (GUERRA, 2009).

A infecção do homem por leptospiros ocorre através de abrasões, arranhões, cortes na pele ou pelas superfícies mucosas da boca, esôfago, olhos, entre outros. Essa infecção pode ocorrer de forma direta, quando há um contato direto do homem com urina, sangue ou tecidos do animal contaminado, ou indireta através do contato com água ou solo contaminados com a urina de um animal infectado (GUERRA, 2009; ADLER et al., 2011). Depois de invadir o organismo, leptospiros patogênicas se disseminam pela circulação sanguínea e linfática para todos os tecidos e se multiplicam no fígado, pulmão e baço, estabelecendo a infecção (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; PALANIAPPAN et al., 2007). A partir daí desencadeiam uma série de manifestações clínicas. O período de incubação da bactéria geralmente é de 7-14 dias, mas pode variar de 2 a 30 dias (VIJAYACHARI; SUGUNAN; SHRIRAM, 2008).

Classicamente, os sintomas ou manifestações clínicas da leptospirose podem ser divididos em dois períodos. Inicialmente os sintomas se assemelham aos de muitas outras doenças infecciosas, sendo inespecíficos, como: cefaléia intensa, febre, náuseas, calafrios, diarreia, vômito, dores nas articulações, entre outros. A segunda fase da doença é conhecida como fase imune. Anticorpos contra as bactérias começam a ser produzidos e as leptospiros passam a ser excretadas na urina. Nesta fase o paciente pode apresentar uma aparente melhora, mas em seguida apresenta febre recorrente além de sinais típicos, como icterícia e insuficiência renal. No entanto, na maioria das vezes (80-90% dos casos) a infecção por *Leptospira* resulta em sintomas leves e os pacientes se recuperam rapidamente sem quaisquer complicações. Manifestações graves ocorrem em 10-15% dos pacientes. (LEVETT, 2001; ABDULKADER; SILVA, 2008; GUERRA, 2009; HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). Nesses casos, há possibilidade do desenvolvimento de complicações devido ao comprometimento de múltiplos órgãos e sistemas, como é o caso do desenvolvimento de hemorragia pulmonar, que pode levar o paciente a óbito. A figura 1 apresenta um esquema da evolução da doença.

Figura 1 – Esquema da evolução da leptospirose

Legenda: Representação esquemática da evolução da leptospirose e sua natureza bifásica. Informações relevantes dos diferentes estágios da doença.

Fonte: Levett, P.N. (2001) adaptado por Wolff, D.G. (2013)

O polimorfismo dos sintomas clínicos da leptospirose dificulta seu diagnóstico. Portanto, é de extrema importância a realização de exames laboratoriais para confirmação da doença (FAINE *et al.*, 1999). A presença de leptospiras, fragmentos de DNA bacteriano ou a detecção de anticorpos específicos fornecem a confirmação laboratorial da leptospirose. Os ensaios mais utilizados no diagnóstico da doença são: o Teste de Aglutinação Microscópica (MAT), a Hemoaglutinação Indireta (IHA) e os testes imuno-enzimáticos (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Tratamento antimicrobiano é indicado para os pacientes com a doença. Diversos antibióticos, como ceftriaxona, penicilina G, cefotaxima e doxiciclina podem ser eficazes contra a leptospirose. A administração adequada de antimicrobianos é essencial para um resultado favorável no tratamento de pacientes com a doença moderada ou grave (GUERRA, 2009).

Estudos vêm sendo realizados visando ao desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a leptospirose. Algumas vêm sendo utilizadas desde 1920 em humanos e animais. Em sua maioria foram desenvolvidas a partir de bactérias mortas por uma

variedade de métodos, incluindo calor, formol, irradiação, etc. (LEVETT, 2001; ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Atualmente alguns países se destacam no desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose, entre eles a China, Cuba, Rússia e França. As vacinas contendo leptospiras inteiras mortas têm sido utilizadas com sucesso na China, Japão e Vietnã. Cuba vem desenvolvendo uma vacina trivalente, utilizando três sorovares diferentes de *Leptospira* prevalentes localmente (LEVETT, 2001; ADLER; MOCTEZUMA, 2010). As vacinas contra leptospirose normalmente são desenvolvidas levando-se em conta os sorovares endêmicos de um determinado local, de modo que atendam as necessidades da região (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

A imunidade contra a leptospirose é basicamente humoral e relativamente sorotipo-específica. Assim sendo, a vacinação protege apenas contra a doença causada pelo sorotipo homólogo ou antigenicamente semelhante (LEVETT, 2001; ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Apesar dos esforços e dos avanços nos estudos em direção ao desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a leptospirose, muito ainda precisa ser feito nesse sentido, para que se possa obter uma vacina humana eficiente. A tendência atual é investir em vacinas de subunidade, baseadas em antígenos proteicos conservados, visando à obtenção de uma cobertura mais abrangente.

1.2 A BACTÉRIA LEPTOSPIRA

A bactéria leptospira pertence à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae* e gênero *Leptospira* (FAINE et. al., 1999). São espiroquetas aeróbios estritos, com forma delgada, estrutura helicoidal, normalmente apresentando extremidades formando ganchos semicirculares. Apresentam aproximadamente 6 a 20 µm de comprimento e 0,1 µm de largura (LEVETT, 2001), sendo visualizadas em microscópio de campo escuro. Possuem dois filamentos axiais (flagelos periplasmáticos) que lhes proporcionam capacidade de motilidade através de movimentos de rotação e translação (LEVETT, 2001). A morfologia externa da bactéria pode ser observada na figura 2.

Figura 2 - Imagem de *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae

Legenda: Imagem de *L. interrogans* obtida por microscopia eletrônica de varredura (filtro de 0,22 μm).
Fonte: LEVETT, P.N. (2001)

Leptopiras têm como temperatura ótima de crescimento 30°C e são capazes de formar biofilme, o que favorece a sobrevivência de estirpes patogênicas no ambiente, aumentando suas chances de colonizar o hospedeiro quando em contato (RISTOW et al., 2008).

A classificação das leptopiras é bastante discutida até os dias de hoje. Análises filogenéticas com base nos genes que codificam o RNAr 16S sugerem a existência de três grupos: patogênicas, não patogênicas, também chamadas de saprófitas, e um grupo intermediário (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

Tradicionalmente, o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies até 1989: *L. interrogans* incluindo as estirpes patogênicas e *L. biflexa* compreendendo as saprófitas (LEVETT, 2001; LEVETT et al., 2005; XUE; YAN; PICARDEAU, 2009; EVANGELISTA; COBURN, 2010; SMYTHE et al., 2013). Porém, a classificação aceita atualmente, realizada por análises de hibridização de DNA, indica a existência de pelo menos 19 espécies, sendo 6 saprófitas e 13 patogênicas (EVANGELISTA; COBURN,

2010). Das 13 patogênicas acredita-se que as principais causadoras de leptospirose são: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. kirschneri* e *L. alexanderi* (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

A composição antigênica das leptospirosas permite a classificação em 24 sorogrupos e 250 sorovares (EVANGELISTA; COBURN, 2010). A diversidade dos sorovares tem relação direta com a heterogeneidade do LPS (lipopolissacarídeo) em sua estrutura; assim, os sorovares semelhantes do ponto de vista antigênico são agrupados nos sorogrupos (BHARTI et al., 2003).

1.3 SISTEMA COMPLEMENTO E INFECÇÃO

Após a entrada no hospedeiro, leptospirosas não-patogênicas são rapidamente eliminadas da corrente sanguínea, ao passo que as patogênicas, quando presentes em grande número, são capazes de sobreviver, se multiplicar e desencadear uma resposta imune específica (FAINE et al., 1999). Isto se deve, basicamente, a dois mecanismos: a capacidade que estes organismos apresentam de aderir a células eucariotas e a proteínas de matriz extracelular (TSUCHIMOTO et al., 1984; VINH; FAINE; ADLER, 1984; BALLARD et al., 1986; THOMAS; HIGBIE, 1990; BARBOSA et al., 2006; CHOY et al., 2007; STEVENSON et al., 2007; ATZINGEN et al., 2008; HAUKE et al., 2008; HOKE et al., 2008) e a habilidade de escapar aos mecanismos de defesa do hospedeiro, dentre os quais os sistemas complemento e fagocitário (CINCO; BANFI, 1983; CINCO et al., 2002; MERI et al., 2005; BARBOSA et al., 2009).

Composto por mais de 30 proteínas de fase fluida ou associadas à membrana, o sistema complemento constitui a primeira linha de defesa do organismo. A exposição de microorganismos ao complemento pode levar à ativação de três diferentes vias: a via alternativa, ativada pela deposição de C3b na superfície do patógeno; a via clássica, ativada por complexos antígeno-anticorpo, LPS bacteriano ou ácidos nucleicos; e a via das lectinas, ativada pela ligação da lectina ligadora de manose (MBL) a resíduos de açúcar presentes na superfície bacteriana. As três vias levam à formação da C5 convertase que, por fim, desencadeia a montagem do

complexo de ataque à membrana (MAC), constituído pelos componentes C5b6,7,8,9 (SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010).

A fim de se evitar uma ativação inadequada com consequentes danos às células do hospedeiro, além do consumo exagerado de proteínas do complemento, é fundamental que haja uma regulação precisa deste sistema. Esse controle é garantido por uma série de reguladores que limitam a formação de C3b ou impedem a inserção do MAC nas células hospedeiras. Entre os principais reguladores solúveis do sistema complemento encontram-se o Fator H (FH), “C4b Binding Protein” (C4BP), Inibidor de C1 (C1-INH), vitronectina e clusterina. Há também reguladores de membrana como “Membrane Cofactor Protein” (MCP), “Decay Accelerating Factor” (DAF), “Complement Receptor-1” (CR1) e CD59 (CALICH; VAZ, 2009).

Vários microorganismos patogênicos expressam proteínas de superfície que mimetizam moléculas das células hospedeiras com capacidade de interagir com reguladores negativos do sistema complemento e essa estratégia permite que eles sobrevivam *in vivo*. Leptospiras patogênicas são capazes de se ligar a FH (MERI et al., 2005) e a C4BP (BARBOSA et al., 2009). Acredita-se que a aquisição destes reguladores do sistema complemento contribua para a resistência à atividade bactericida do soro apresentada por essas bactérias. A identificação dos receptores bacterianos envolvidos na interação com estes reguladores é de grande importância, uma vez que representam alvos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e/ou preventivas que possam interferir no processo de evasão imune de leptospiras patogênicas.

1.4 PROTEÍNAS *MOONLIGHTING*

Proteínas *moonlighting* constituem um grupo de proteínas que exercem mais de uma função (proteínas multitarefa ou multifuncionais) (JEFFERY, 2009; COPLEY, 2012). Esse grupo de proteínas inclui várias enzimas, fatores de transcrição, além de proteínas com diversas outras funções (JEFFERY, 2009). As proteínas *moonlighting* mais conhecidas e bem caracterizadas em animais e humanos estão descritas no quadro 1.

Quadro 1 – Exemplos de proteínas *moonlighting* de animais e humanos e suas diferentes funções

Proteína	Organismo	Funções
Aconitase	<i>Homo sapiens</i>	Homeostase do ferro
		Atua no Ciclo de Krebs
Fator de ativação de transcrição 2 (ATF2)	<i>Homo sapiens</i>	Resposta a danos no DNA
		Fator de transcrição
Citocromo C	Vários	Metabolismo energético
		Apoptose
Desidrogenase Dihidrolipoamida (DLD)	<i>Homo sapiens</i>	Metabolismo energético
		Protease
Complexo ESCRT-II	<i>Drosophila melanogaster</i>	Triagem de proteína endossomal
		Localização do RNAm bicóide
Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3)	<i>Mus musculus</i>	Transporte de eletrons
		Fator de transcrição

Fonte: Huberts, D. H. E. W; Van Der Klei, I. J. (2010) adaptado por Wolff, D.G. (2013)

Além dos estudos de proteínas *moonlighting* em animais e humanos, plantas e procariotos vêm sendo amplamente estudados a fim de se caracterizar funcionalmente essas proteínas nesses grupos. O quadro 2 apresenta as proteínas *moonlighting* melhor caracterizadas em plantas e procariotos.

Quadro 2 - Exemplos de proteínas *moonlighting* e suas funções em plantas e procariotos

Proteína	Organismo	Funções
Plantas		
Hexoquinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Metabolismo da glicose
		Sinalização da glicose
Presenilina	<i>Physcomitrella patens</i>	γ- secretase
		Funções no citoesqueleto
Procariotos		
Aconitase	<i>Mycobacterium tuberculose</i>	Proteína ferro-responsiva
		Atua no Ciclo de Krebs
Enolase	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Enzima glicolítica
		Ligação ao plasminogênio
GroEL	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Chaperona
		Toxina de inseto
Tioredoxina	<i>Escherichia coli</i>	Anti-oxidante
		Subunidade T7 DNA polimerase

Fonte: Huberts, D. H. E. W; Van Der Klei, I. J. (2010) adaptado por Wolff, D.G. (2013)

A alta capacidade que as proteínas *moonlighting* possuem de alternar entre as múltiplas funções é atribuída a mecanismos, como: mudança de temperatura, interação com a membrana celular, secreção para o espaço extracelular, interações com DNA ou RNA, alteração no potencial redox da célula, interações com diferentes cadeias polipeptídicas em diferentes complexos proteicos, alterações na concentração celular de determinado ligante, substrato ou cofator, e muitos outros mecanismos que permitem que estas proteínas desempenhem a função de maior necessidade para a célula ou organismo naquele momento (JEFFERY, 2009). Além dessa capacidade, as proteínas *moonlighting* apresentam uma independência de suas funções, isto é, a inativação de uma das suas atividades por qualquer motivo não afeta o desenvolvimento das outras funções por elas desempenhadas (HUMBERTS; VAN DER KLEI, 2010).

Os primeiros relatos sobre proteínas *moonlighting* foram descritos no fim de 1980 quando Piatigorsky e Wistow mostraram que proteínas estruturais do olho de vertebrados (cristalino nas lentes oculares) eram idênticas a várias enzimas metabólicas. Como exemplo, a ϵ -cristalina de patos assemelha-se à lactato desidrogenase (LDH), uma enzima presente tanto em plantas como animais, desempenhando papel importante no metabolismo dos glicídeos e a τ -cristalina de tartaruga é similar à enzima glicolítica α -enolase de humanos, uma enzima que desempenha papel importante na glicólise. Nos últimos 20 anos, centenas de outras proteínas *moonlighting* já foram descobertas e descritas em muitas espécies, incluindo leveduras, plantas, animais e procariotos. As mais bem caracterizadas são as de levedura, devido ao fato de estes organismos serem extensivamente mais estudados que os demais (HUMBERTS; VAN DER KLEI, 2010; COPLEY, 2012).

Normalmente, as proteínas *moonlighting* são altamente conservadas e distribuídas em diversos organismos. Geralmente são constitutivamente expressas em níveis elevados, o que favorece o estudo e identificação das mesmas. Estão normalmente envolvidas em funções fisiológicas básicas, como angiogênese, motilidade celular, síntese e reparo de DNA, transporte transmembrânico, metabolismo celular, além de participarem de vias bioquímicas importantes de doenças, incluindo câncer (HJEFFERY, 2009; HUMBERTS; VAN DER KLEI, 2010).

Estudos recentes mostram que muitas dessas proteínas *moonlighting* desempenham um papel importante na virulência de bactérias, normalmente atuando na adesão e modulação da atividade leucocitária. Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é um importante exemplo de proteína *moonlighting*, apresentando uma impressionante variedade de funções associadas à virulência bacteriana. Ela está envolvida na apoptose, transporte vesicular e exportação de tRNA nuclear. Em *Bacillus anthracis* encontra-se na superfície e é excretada para o meio. Pela sua capacidade de se ligar a plasminogênio com a consequente conversão em plasmina, facilita a invasão do microorganismo. Estreptococos do grupo A também exibem GAPDH na superfície, favorecendo sua ligação a fibronectina e lisozima, contribuindo assim, para a virulência de *Streptococcus agalactiae* (COPLEY, 2012).

Outra proteína que vem sendo bastante estudada e apresenta diferentes funções em microorganismos diversos é a enolase. Em *Streptococcus gordonii*

participa da ligação à mucina salivar (Muc7) enquanto que em *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus anthracis*, *Bifidobacterium* spp., *Mycoplasma fermentans* tem importante participação na ligação ao plasminogênio e em *Staphylococcus aureus* participa da ligação a laminina (HENDERSON; MARTIN, 2011).

Uma outra proteína *moonlighting* importante é o fator de alongação Tu (EF-Tu), que pode desempenhar diferentes funções, como por exemplo, servir de receptor para proteínas do hospedeiro, quando presente na superfície de patógenos, e fator de alongamento da tradução, sua função clássica no citoplasma. EF-Tu será descrito em maiores detalhes no item que se segue, uma vez que foi objeto de estudo desse trabalho de mestrado.

1.5 FATOR DE ELONGAÇÃO Tu (ELONGATION FACTOR Tu)

EF-Tu é uma das GTPases responsáveis pelo alongamento da cadeia polipeptídica do ribossomo durante a síntese protéica, e o que o difere de outras GTPases como EF-G (Elongation Factor G) é sua atuação em diferentes fases do ciclo de alongação (NILSSON; NISSEN, 2005; SERGIEV; BOGDANOV; DONTSOVA, 2005). Apresentando 43 kDa (WEBER; LOTTSPEICH; KÖHL, 1995), EF-Tu é uma das proteínas mais abundante em procariotos, totalizando 5-10% do conteúdo proteico de *E.coli*, e aproximadamente 10% da proteína total de *Mycoplasma pneumoniae* (WEIJLAND et al., 1992; WEBER; LOTTSPEICH; KÖHL, 1995; CLARK; NYBORG, 1997; PARMEGGIANI; NISSEN, 2006). Durante a síntese protéica, EF-Tu cataliza a ligação de cada aminoacil-tRNA ao ribossomo (PARMEGGIANI E SWART, 1985). Trata-se de uma proteína multifuncional que interage com várias macromoléculas e nucleotídeos guanina, incluindo EF-Ts, GDP, GTP e algumas proteínas ribossomais (WEBER; LOTTSPEICH; KÖHL, 1995). Além de seu papel na síntese protéica, funções diversas têm sido atribuídas ao fator de alongação Tu, dentre as quais a capacidade de agir como uma chaperona (CALDAS; EL YAAGOUBI; RICHARME, 1998) e atividade de proteína dissulfeto isomerase (RICHARME, 1998). Na presença de altas concentrações de ferro, EF-Tu é positivamente regulado (WONG et al., 1999). Forma feixes de filamentos *in vitro* e especula-se que seja um elemento estrutural da rede do citoesqueleto (MAYER, 2003). Em eucariotos, essa

proteína, denominada EF-1 α , liga-se a filamentos de actina e a microtúbulos, e influencia a montagem e a estabilidade de polímeros do citoesqueleto (MOORE; DURSO; CYR, 1998; GROSS; KINZY, 2005).

Embora desempenhe uma série de funções no citoplasma, EF-Tu foi também observado na membrana de vários procariotos, após sofrer modificações pós-traducionais. Em *E. coli*, a proteína é transferida do citoplasma para o periplasma durante o choque osmótico (BERRIER et al., 2000) e para a membrana em condições de privação nutricional, quando subpopulações da proteína sofrem metilação (YOUNG; BERNLOHR, 1991). Análises proteômicas demonstraram que EF-Tu é um dos componentes abundantes da parede celular de *Mycobacterium leprae* (MARQUES et al., 1998) e é um componente periplasmático em *Neisseria gonorrhoeae* (PORCELLA; BELLAND; JUDD 1996). Em *M. pneumoniae*, 17% do total de EF-Tu é observado na fração de membrana (DALLO et al., 2002). A versatilidade biológica e funcional dessa proteína revela-se em sua capacidade de interagir com proteínas da matriz extracelular, moléculas da cascata de coagulação, reguladores solúveis do sistema complemento e outras glicoproteínas. Em *M. pneumoniae*, EF-Tu associada à membrana é capaz de interagir com fibronectina, uma glicoproteína abundante na matriz extracelular que desempenha papel crucial na adesão celular (BALASUBRAMANIAN; KANNAN; BASEMAN, 2008), ao passo que EF-Tu de *Lactobacillus johnsonii* e *Listeria monocytogenes* liga-se à mucina e ao fibrinogênio respectivamente (GRANATO et al., 2004; SCHAUMBURG et al., 2004). Em *M. tuberculosis*, EF-Tu é capaz de se ligar ao plasminogênio (XOLALPA et al., 2007). Recentemente, demonstrou-se que essa proteína de *Pseudomonas aeruginosa* interage com Fator H humano e com plasminogênio favorecendo assim a adesão e destruição tecidual bem como a evasão ao sistema imune do hospedeiro (KUNERT et al., 2007). Portanto, EF-Tu integra o grupo de proteínas que exibem funções biológicas inusitadas, além daquelas já bem definidas e caracterizadas na literatura.

As interações entre EF-Tu de patógenos e moléculas hospedeiras é dependente da localização desta proteína na célula. Para que isso ocorra é fundamental que EF-Tu também se localize na membrana do microorganismo, ou seja, esteja exposto e acessível para estabelecer interações. Em *Escherichia coli*, EF-Tu pode ser encontrado no citoplasma, no periplasma e na membrana e em *Mycobacterium leprae*, *Lactobacillus johnsonii* e *Listeria monocytogenes* foi

identificada como uma importante proteína de parede celular (BALASUBRAMANIAN; KANNAN; BASEMAN, 2008).

Dados oriundos do sequenciamento dos genomas de *Leptospira* nos últimos anos revelaram que esta bactéria espiroqueta também possui EF-Tu. Neste microorganismo, a proteína possui 401 aminoácidos e é altamente conservada quando comparada à sequência de outros procariotos. Um estudo recente de análise proteômica com extratos totais de *Leptospira* mostrou que EF-Tu é uma proteína abundante deste patógeno (VIEIRA et al., 2009).

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi caracterizar esta proteína em *Leptospira*, no que diz respeito à localização celular e avaliação de sua interação com reguladores do sistema complemento humano, componentes da matriz extracelular e moléculas da cascata de coagulação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar funcionalmente o Fator de Elongação Tu (EF-Tu) de *Leptospira*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Clonar, expressar e purificar EF-Tu de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni;
2. Avaliar sua localização na membrana da bactéria com anticorpos específicos contra a proteína recombinante;
3. Realizar ensaios funcionais visando avaliar a interação de EF-Tu com reguladores do sistema complemento humano, componentes da matriz extracelular e moléculas da cascata de coagulação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

O preparo dos reagentes bem como dos meios de cultura foi realizado conforme descrito em manual de laboratório (SAMBROOK et al., 1989).

3.1.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados nos diferentes procedimentos desse trabalho, bem como suas composições, estão descritos no quadro 3.

Quadro 3 - Descrição dos reagentes e soluções utilizados nos diferentes procedimentos.

(Continuação)

Produção de Bactérias Competentes	
Solução RF	Cloreto de magnésio 1 M
Solução RF I	Acetato de potássio 30 mM, cloreto de cálcio 10 mM, cloreto de manganês 50 mM, cloreto de potássio 100 mM e glicerol 15%, em água Milli Q, pH 5,8
Solução RF II	Cloreto de cálcio 75 mM, cloreto de magnésio 20 mM, cloreto de potássio 10 mM, MOPS 10 mM e glicerol 15%, em água Milli Q, pH 6,8
Transformação Bacteriana	
Amp	Ampicilina
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosídeo
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
Eletroforese em gel de agarose	
Tampão TAE	Tampão Tris-Acetato 40 mM pH 8,5, EDTA 1 mM, pH 8,5
Gel de agarose	1% de agarose em 10mL de tampão TAE
Tampão de amostra 6x	Azul de bromofenol 0,25%; xilenocianol 0,25%; glicerol 30%

Quadro 3 - Descrição dos reagentes utilizados nos diferentes procedimentos.

(Continuação)

Método fenol-clorofórmio para seleção de clones positivos	
Solução fenol/clorofórmio (1:1)	Fenol 50% pH 7,6 e clorofórmio 50%
Tampão de amostra 6X	Tampão Ficoll dye 6X (Promega)
Eletróforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	
Acrilamida 30%	Acrilamida 29% e N,N'-metilenobisacrilamida 1%
Tampão Tris-HCl pH 8,8	Tampão Tris-HCl 1,5 M e SDS 0,1%, pH 8,8
Tampão Tris-HCl pH 6,8	Tampão Tris-HCl 0,5 M e SDS 0,1%, pH 6,8
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
Solução de persulfato de amônio (APS)	Persulfato de amônio 10%
Tampão de amostra redutor 5 X	Tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 100 mM e SDS 2%
Tampão de amostra não redutor 5 X	Tampão de amostra redutor 5X sem β -mercaptoetanol
Tampão de corrida	Tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3
Solução corante	Ácido acético glacial 10%, etanol 45% e azul Coomassie R250 0,25%
Solução descorante	Ácido acético glacial 10% e etanol 30%
Solução secante	Ácido acético glacial 10% e etanol 50%
Determinação dos títulos de anticorpos	
Solução de lavagem	PBS 1X + Tween 0,05%
Solução de diluição	PBS 1X + Tween 0,01% + Leite desnatado 0,1%
Solução de bloqueio	Leite desnatado 10% diluído em solução de lavagem
Western blot	

Quadro 3 - Descrição dos reagentes utilizados nos diferentes procedimentos.

(Continuação)

Tampão de transferência	Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,02% e álcool etílico (etanol) 20%
PBS	NaCl 1,37 M; KCl 0,027 M; Na ₂ HPO ₄ 0,10 M; KH ₂ PO ₄ 0,017 M; pH 7,4
PBS-T	PBS e Tween 20 0,05%
Tampão de Bloqueio	PBS-T contendo 10% de leite em pó desnatado
Solução de Ponceau	Ponceau S 0,5% e ácido acético glacial 10%
Solução para diluição de anticorpos	PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado
Solução de revelação	Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) que contém duas soluções: uma com luminol e um amplificador da reação, e outra com H ₂ O ₂ .
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	
PBS	KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, fosfato dibásico de sódio 8,1mM e fosfato monobásico de potássio 1,5 mM; pH 7,4
Solução de lavagem	PBS-Tween 20 0,05%
Solução de bloqueio	PBS-T 0,05% contendo 10% de leite em pó desnatado
Solução de revelação	o-dihidrocloreto de felilenodiamina 0,05% e H ₂ O ₂ 0,015%, em tampão citrato-fosfato (citrato de sódio dibásico 0,1 M; fosfato de sódio monobásico 0,2 M) pH 5,0
Solução de parada	Ácido sulfúrico 4 N
Purificação de EF-Tu	
Tampão de lavagem do corpúsculo	PBS pH 7,4; NaCl 500 mM; β-mercaptoetanol 5 mM
Tampão de solubilização do corpúsculo	PBS pH 7,4; imidazol 5 mM e uréia 8 M
Solução de lavagem	PBS pH 7,4; imidazol 5 Mm
Solução de eluição	PBS pH 7,4; imidazol 5 mM e imidazol (20mM – 1M)
Tampão de diálise	PBS 1 X e glicina 0,1%
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)

Quadro 3 - Descrição dos reagentes utilizados nos diferentes procedimentos.

(Conclusão)

Uréia 8 M	Uréia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)
Níquel 0,3 M	Níquel ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

3.1.2 Meios de cultura para bactérias

Todos os meios de cultura utilizados foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos para esterilização e, após o resfriamento, soluções de antibióticos estéreis foram adicionadas seguindo a concentração final desejada. A relação dos meios de cultura utilizados e suas composições estão descritas no quadro 4.

Quadro 4 – Descrição dos meios de cultura utilizados

Meios de cultura líquidos	
LB	Triptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1,0%
LB-amp	Meio LB com ampicilina 100 µg/mL
LB/ON	Triptona 1,0% e extrato de levedura 0,5%
2YT	Triptona 1,6%, extrato de levedura 1,0% e NaCl 0,5%
2YT-amp	Meio 2YT com ampicilina 100 µg/mL
2YT/ON	Triptona 1,6% e extrato de levedura 1,0%
Meios de cultura sólidos	
<p>Para a obtenção dos meios sólidos foi adicionado 1,5% de ágar na composição dos meios líquidos. Após o esfriamento, aproximadamente 30mL de meio foram colocados em placas de Petri e aguardou-se solidificação para utilização.</p> <p>Para os meios sólidos com antibiótico adicionou-se 100 µg/mL antes do plaqueamento.</p>	

3.2 BACTÉRIAS

3.2.1 Cepas bacterianas

Para o desenvolvimento deste trabalho foram usadas duas cepas bacterianas, ambas mantidas em glicerol 20% a -80°C. O objetivo da manutenção em glicerol é conservar as células, pois o congelamento impede que a estrutura celular seja danificada. No momento da utilização, as bactérias foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido apropriado. As cepas de *Escherichia coli* utilizadas para produção da proteína EF-TU recombinante foram:

A. *E. coli* DH5- α : Bactéria utilizada para clonagem dos fragmentos. Os clones positivos (portadores de plasmídeo) foram selecionados pelo crescimento das colônias em meio contendo X-gal, um substrato cromogênico para β -galactosidase e IPTG, um indutor da atividade de β -galactosidase em bactérias.

B. *E. coli* BL21 (SI) Star[pLysS]: Bactéria utilizada para expressão de proteínas recombinantes após indução com 200 mM de NaCl.

3.2.2 Preparo de bactérias competentes

No processo de transformação bacteriana ocorre a introdução de DNA exógeno, também chamado de plasmídeo, nas células bacterianas. Dessa forma, esse DNA passa a fazer parte do material genético da bactéria, podendo ser passado para as próximas gerações originadas da multiplicação da célula mãe. Assim sendo, a bactéria hospedeira pode adquirir certas propriedades, como por exemplo, a resistência a antibióticos. É importante salientar que a bactéria necessita apresentar condições fisiológicas especiais para permitir a entrada do DNA exógeno. Por isso, para transformação bacteriana, utilizam-se bactérias chamadas competentes, que foram tratadas com o objetivo de alterar a permeabilidade da parede celular, permitindo assim a entrada do DNA exógeno com mais facilidade.

Para obtenção de bactérias competentes, uma colônia foi isolada e inoculada em 5 mL de meio líquido apropriado. Essa cultura foi colocada a 37°C, sob agitação de 230 rpm, durante 16-20 horas. Dois mL do pré-inóculo foram adicionados a 100 mL de meio líquido pré-aquecido, mantendo as mesmas condições de crescimento até se atingir uma D.O. em 600_{nm} entre 0,6 e 0,8.

A cultura foi resfriada no gelo e adicionou-se 1 mL de solução RF agitando-se bem. Após repouso no gelo por 15 minutos, a cultura foi dividida em dois tubos Falcon e centrifugou-se a 1960 *g* por 15 minutos a uma temperatura de 4°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* bacteriano em 20 mL de solução RFI gelada. A cultura foi mantida em repouso no gelo por 15 minutos e, em seguida, procedeu-se à centrifugação sob as mesmas condições e tempo. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 2 mL de solução RFII. A suspensão foi aliquoteada (50 µL/tubo) e armazenada a -80°C até o uso.

3.2.3 Transformação bacteriana

3.2.3.1 Transformação de DH5α

Para a transformação de bactérias *E. coli* DH5α prepararam-se placas com meio de cultura (LB) com antibiótico (ampicilina) adicionando-se IPTG e X-gal. Descongelou-se a bactéria competente por 10 a 15 minutos no gelo, acrescentou-se 2,5 µL do produto de ligação previamente preparado e deixou-se em repouso no gelo por 20 minutos. Deu-se um choque térmico de 40 segundos a 42°C. Manteve-se a preparação no gelo por mais 2 minutos. Adicionaram-se 950 µL de meio de cultura (o mesmo utilizado nas placas, porém, líquido). O conteúdo foi transferido para tubos maiores. Procedeu-se à agitação de 230 rpm por 1 hora, a 37°C. Plaqueou-se 1 mL em placa com o meio de cultura sólido com ampicilina e levou-se para crescer em estufa a 37°C por 16-20 horas.

3.2.3.2 Transformação de BL21-SI

Para transformar bactérias *E. coli* BL21 -SI prepararam-se placas com meio de cultura (2YT-ON) com antibiótico (ampicilina). Descongelou-se a bactéria competente por 15 minutos no gelo, acrescentou-se 1 µL da minipreparação plasmidial. A mistura foi mantida no gelo por 30 minutos e em seguida submetida a choque térmico por 2 minutos a 42°C sendo mantida no gelo por mais 5 minutos. Para que as bactérias pudessem ser recuperadas foram adicionados 350 µL do meio 2YT-ON e incubou-se a 30°C por 1 hora, sob agitação de 230 rpm. Posteriormente as culturas foram plaqueadas em meio sólido 2YT-ON contendo antibiótico, e incubadas a 30°C por 16-20 horas.

3.3 VETORES UTILIZADOS

Para clonagem do gene que codifica EF-Tu (LIC12875) foi utilizado o vetor pGEM-T easy, cujas características estão especificadas abaixo.

3.3.1 pGEM-T easy

O gene que codifica EF-Tu (LIC12875) foi amplificado por PCR e clonado no vetor pGEM-T easy. A figura 3 apresenta o mapa do vetor, que permite a clonagem de produtos de PCR através da ligação A – T. Possui f1 ori, amp^R e *lacZ* e permite a distinção entre colônias negativas (azuis) e positivas (brancas) pela adição de X-gal ao meio de cultura. Contém sítios múltiplos de clonagem (SMC) permitindo a liberação do inserto usando enzimas de restrição apropriadas.

Figura 3 – Vetor pGEM-T Easy.

Legenda: Representação esquemática do vetor de clonagem pGEM-T Easy.
Fonte: (PROMEGA).

O vetor pAE foi utilizado para expressão da proteína EF-Tu recombinante em *E. coli*. Suas principais características estão descritas abaixo:

3.3.2 pAE

O vetor pAE foi construído a partir dos plasmídeos pRSET e pET3-His (RAMOS et al.,2004). Possui promotor do fago T7 (controla a clonagem do gene de interesse), sítio de ligação ao ribossomo (RBS), sítios para múltiplas clonagens (SMC), terminador de transcrição (term) e sequência codificadora para β -lactamase que confere resistência à ampicilina (AMP). Possui uma região codificadora para 6 resíduos de histidina (His) na extremidade amino-terminal da proteína recombinante que permite a purificação por cromatografia de afinidade a metal.

O mapa do vetor de expressão pAE está representado na figura 4.

Figura 4 – Vetor pAE.

Legenda: Representação esquemática do vetor pAE contendo o mapa de restrição.
Fonte: (RAMOS et al., 2004).

3.4 AMPLIFICAÇÃO DO GENE POR PCR

A sequência completa do gene EF-TU (LIC12875) foi amplificada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 10A com os oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) iniciadores *forward* (F) 5' CGCTCGAGGCTAAAGAAAAG 3' e *reverse* (R) 5' GCGAAGCTTTTACTCAGTG 3' contendo sítios de restrição *Xho* I e *Hind* III. A banda correspondente ao produto amplificado foi visualizada em transluminador após eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE corado com brometo de etídio. As condições de preparo da reação de PCR estão descritas nos quadros 5 e 6.

Quadro 5 - Reação de amplificação do gene EF-Tu (PCR).

(Continuação)

Reagente	Concentração Inicial	Concentração Final	Quantidade (µL)
Tampão	10 X	1 X	4
Dntp	10 mM	200 µM	0,8
MgSO ₄	50 µM	2,5 µM	2

Quadro 5 - Reação de amplificação do gene EF-Tu (PCR).

(Conclusão)

Primer <i>forward</i>	10 μ M	0,25 μ M	1
Primer <i>reverse</i>	10 μ M	0,25 μ M	1
Taq polimerase DNA	5 U/ μ L	2,5 U	0,5
DNA <i>Leptospira</i> (Copenhageni)	114 ng/ μ L	114 ng	1
Água Milli Q estéril			29,7
Volume total			40

Quadro 6 – Condições da reação de PCR

	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1. Desnaturação inicial	1	94	5 min
2. Desnaturação	40	94	45 s
3. Anelamento		50	45 s
4. Extensão		72	1 min 30 s
5. Extensão final	1	72	7 Min

3.5 CLONAGEM DO GENE EF-Tu NO VETOR pGEM-T easy

Os fragmentos amplificados foram excisados do gel de agarose e purificados utilizando-se o kit PureLink (Quick Gel Extraction Kit) da Invitrogen.

A reação de ligação do fragmento gênico ao vetor de clonagem pGEM-T easy foi feita em volume de 20 μ L (Quadro 7) e mantida a 4°C por 16-20 horas.

Quadro 7 – Reação de ligação do fragmento gênico ao vetor de clonagem pGEM-T easy.

Componente	Volume para 20 µL	Concentração
Tampão Rapid Ligation 2X	10 µL	1 X
Vetor pGEM-T easy	1 µL	50 ng
Fragmento gênico purificado	8 µL	~ 100 ng
Enzima T4 DNA ligase	1 µL	3 U

As bactérias DH5α foram transformadas com 2,5 µL do produto de ligação. As colônias foram então plaqueadas em meio LB/Amp/Agar contendo IPTG e X-gal e incubadas por 16-20h a 37°C. Algumas colônias foram selecionadas e testadas por PCR com os oligonucleotídeos específicos para EF-Tu, a fim de se confirmar a presença do inserto.

3.5.1 Seleção de clones positivos pelo método fenol-clorofórmio

Para confirmar a clonagem dos fragmentos no vetor pGEM-T easy foi feita a comparação da mobilidade entre os plasmídeos recombinantes e o vetor vazio por eletroforese em gel de agarose segundo Beuken; Vink; Bruggeman (1998).

Colônias isoladas de *E. coli* DH5α crescidas em placa LB-amp a 37°C por 16 horas foram inoculadas em 2,5 mL de meio líquido LB-amp e incubadas por 16 horas a 37°C sob agitação de 130 rpm. Trezentos µL da cultura foram separados e submetidos a centrifugação a 15.400 g por 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante e solubilizou-se o *pellet* celular em 50 µL de água Milli Q. Adicionaram-se 28 µL de solução fenol-clorofórmio (1:1) e 20 µL de tampão de amostra Ficoll Dye 6X. Misturou-se bem o conteúdo no vortex e centrifugou-se por 3 minutos a 15.400 g. Uma alíquota de 15 µL do sobrenadante dessa mistura contendo DNA genômico, plasmidial e RNA foi aplicada em gel de agarose 1%. Alguns clones foram selecionados, pela diferença de mobilidade eletroforética entre os DNAs, para posterior purificação e sequenciamento.

3.5.2 Mini-preparação de DNA plasmidial

As culturas contendo plasmídeos recombinantes foram utilizadas para a extração dos plasmídeos utilizando-se o kit de mini-preparação comercial da Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit). As construções foram analisadas por sequenciamento

3.5.3 Sequenciamento

A análise da sequência de DNA dos plasmídeos recombinantes e dos fragmentos de DNA amplificados por PCR foi feita pelo método de Sanger (SAMBROOK et al., 1989), adaptado para seqüenciador automático capilar ABI3100 (Perkin Elmer), do Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan.

O sequenciamento foi feito utilizando-se 500 ng das mini-preparações de DNA plasmidial e 3,2 pmol de *primers* em água Milli-Q autoclavada. Empregou-se o kit Big Dye Terminator, Perkin Elmer, seguindo protocolo do fabricante.

Os primers M13F e M13R (Quadro 8) foram utilizados no sequenciamento dos fragmentos clonados no vetor pGEM-T easy.

Quadro 8 – Primers utilizados no sequenciamento dos fragmentos clonados no vetor pGEM-T easy

Primer	Sequencia
M13 forward	5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'
M13 reverse	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

3.5.4 Digestão com enzima de restrição

As construções plasmidiais em vetor pGEM-T easy foram digeridas com enzima de restrição *EcoR* I. A digestão foi feita a 37°C por 1 hora e o volume final da reação foi 10 µL (Quadro 9).

Quadro 9 – Reação de digestão com enzima de restrição *EcoR* I

Componente	Volume para 10 µL	Concentração
Tampão React 2 10X	1 µL	1 X
Enzima <i>EcoR</i> I	1 µL	10 U
DNA plasmidial	6µL	500 ng
Água milli Q	2 µL	

O produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.6 SUBCLONAGEM DO GENE NO VETOR DE EXPRESSÃO

O inserto LIC12875 clonado no vetor pGEM-T easy foi transferido para o vetor de expressão pAE. Para tanto, as construções obtidas anteriormente bem como o vetor de expressão pAE foram digeridos com enzimas de restrição (*Xho* I e *Hind* III). Os insertos purificados, a partir do gel de agarose, foram subclonados no vetor pAE.

Para a ligação foram utilizados 0,6 µL de enzima DNA ligase (1,8 U), 2µL de tampão *Rapid ligation* 10X, 15 µL de inserto purificado (100 ng) e 2 µL do vetor pAE (100 ng), em um volume final de 20 µL. Essa reação foi incubada a 4°C por 20h. Foram utilizados 5 µL do produto de ligação na transformação de bactérias competentes após choque térmico de 40 segundos a 42°C.

3.7 EXPRESSÃO DE EF-Tu RECOMBINANTE

Bactérias *E. coli* BL21-SI foram transformadas com a construção EF-Tu/pAE e as colônias selecionadas em placas 2YT-ON/amp. Utilizou-se o método fenol-clorofórmio para seleção de clones positivos.

Para indução da expressão da proteína EF-Tu recombinante em *E. coli* foi feito um pré-inóculo de um clone positivo em 20 mL de meio 2YT-ON/amp. O pré-inóculo foi incubado a 30°C com agitação de 130 rpm por 16-20 h. A seguir, transferiu-se o pré-inóculo para um frasco contendo 400 mL de meio 2YT-ON/amp. O inóculo foi incubado sob as mesmas condições anteriores até se atingir D.O_{600nm} entre 0,6 e 0,8. Retirou-se 1 mL do cultivo como controle não induzido. Posteriormente realizou-se indução da expressão proteica pela adição de NaCl para uma concentração final de 200 mM e incubou-se por mais 3 horas. A cultura foi centrifugada a 3.860 g por 15 minutos a uma temperatura de 4°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 30 mL de PBS 1X. Esse produto foi congelado a -20°C até utilização. A indução da expressão da proteína recombinante foi analisada após a eletroforese em gel de pliacrilamida (SDS-PAGE).

3.8 SDS-PAGE (ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA)

As eletroforeses foram realizadas em condições desnaturantes utilizando-se tampão de amostra redutor 5x, aplicando-se uma amperagem de 25 mA a temperatura ambiente. Para o preparo dos géis foi utilizado um mix de acrilamida em diferentes concentrações, sendo 12% para o gel de separação e 5% para o de empilhamento. A espessura dos géis foi de 1 mm. As amostras foram desnaturadas por 3-5 minutos a uma temperatura de 96°C, e então aplicadas no gel. Utilizou-se o marcador de peso molecular Page Ruler (Fermentas) e a coloração dos géis foi feita com solução corante. Os géis foram descorados com solução descorante até que as bandas de proteína ficassem nítidas.

3.9 PURIFICAÇÃO

A proteína EF-TU foi expressa nas formas solúvel e insolúvel. A fração solúvel foi purificada a partir do sobrenadante da cultura e a fração expressa na forma insolúvel (corpúsculos de inclusão) foi purificada após solubilização em ureia 8M.

A purificação da proteína recombinante foi feita por cromatografia de afinidade a metal. Foi utilizada a coluna HisTrap HP (GE Healthcare).

3.9.1 Preparação da coluna HisTrap HP

Após a montagem da coluna, 50 mL da resina (*“Fast Flow chelating Sepharose”* – GE Healthcare) foram aplicados. Após 30 minutos, a ativação da coluna foi feita com 30 mL de sulfato de níquel. Após 30 minutos, a coluna foi lavada com 10 mL de água Milli-Q e foram, a seguir, adicionados 30 mL da solução PBS 1X + imidazol 5 mM para equilibrar a coluna e deixá-la pronta para receber a amostra contendo a proteína EF-Tu.

3.9.2 Purificação de EF-Tu a partir do sobrenadante

Após o equilíbrio da coluna, 20 mL do sobrenadante diluído em 80 mL de solução PBS 1X + imidazol 5 mM foram aplicados na coluna para purificação da proteína expressa na forma solúvel. Lavagens com PBS 1X + concentrações crescentes de imidazol (20-100 mM) foram feitas em seguida e as frações coletadas para aplicação em gel de poliacrilamida. A eluição foi feita com solução PBS 1X + imidazol 1 M e as frações coletadas em tubos *ependorf* para aplicação em gel.

3.9.3 Purificação de EF-Tu a partir do *pellet* bacteriano

A purificação de EF-Tu expressa na forma de corpúsculos de inclusão (insolúvel) foi feita a partir do *pellet* que foi solubilizado em ureia 8 M. A coluna foi lavada e equilibrada como descrito no item 3.9.1 A solução com *pellet* diluído em ureia 8 M foi gotejada em solução PBS 1X + imidazol 5 mM e esta diluição passada pela coluna. Lavagens com PBS 1X + concentrações crescentes de imidazol (20-100 mM) foram feitas em seguida e as frações coletadas para aplicação em gel de poliacrilamida. A eluição foi feita com solução PBS 1X + imidazol 1 M e coletada em tubos *ependorf* para aplicação em gel.

3.9.4 Limpeza da coluna HisTrap HP

A coluna foi lavada com soluções contendo EDTA (100 mM) e ureia (8 M) a fim de remover o níquel e os precipitados existentes. Cloreto de sódio 1,5 M e água Milli-Q foram aplicados subsequentemente para limpeza final da coluna. A conservação da coluna para reaproveitamento foi feita em etanol 20%.

3.9.5 Diálise

A diálise foi feita em tampão de diálise a 4°C. Quatro trocas de tampão foram feitas de 4 em 4 horas.

3.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA

A concentração da proteína EF-Tu recombinante foi estimada por dois métodos distintos:

3.10.1 Bradford

Para se estimar a concentração proteica por esse método diluiu-se cinco vezes o reagente de Bradford. Fez-se então uma curva padrão utilizando de 0-1 mg de BSA com intervalos de 0,2 mg. Em uma placa de 96 poços (Costar) pipetaram-se 100 μ L de reagente de Bradford por poço mantendo-se a placa envolta em papel alumínio para evitar reatividade à luz. Homogeneizaram-se as amostras no vortex e centrifugou-se para evitar perda de volume; pipetou-se então o BSA. Vortexou-se a placa por 1 minuto e incubou-se a temperatura ambiente por 5 minutos. Leu-se em leitor de ELISA (filtro 595 nm).

3.10.2 Gel com curva de LMW (Low Molecular Weight Protein Marker)

Para se estimar a concentração das diferentes amostras de EF-TU recombinante por esse método correu-se um gel de poliacrilamida 12%, 1 mm, fazendo-se uma curva com o marcador de peso molecular LMW. Foram aplicados 10 μ L no primeiro poço, 5 μ L no segundo e 2 μ L no terceiro, seguido das amostras de interesse (16 μ L de cada amostra e 4 μ L de tampão 5 X). Corou-se o gel com corante Comassie Blue, descorou-se com solução descorante e secou-se em papel celofane natural.

A análise do gel foi feita comparando-se a intensidade das bandas das amostras com as bandas do marcador LMW, cujas massas são conhecidas (Quadro 10). O valor obtido foi então dividido pelo volume de proteína aplicado no gel (16 μ L) resultando na concentração da proteína em μ g/ μ L.

Quadro 10 – Dosagem de proteínas recombinantes por curva de LMW com valores já conhecidos.

Dosagem de proteínas recombinantes por curva de LMW			
Banda	2µl (µg)	5µl (µg)	10µl (µg)
97 kDa	0,7	1,675	3,35
66 kDa	0,83	2,075	4,15
45 kDa	1,47	3,675	7,35
30 kDa	0,83	2,075	4,15
20,1 kDa	0,8	2	4
14,4 kDa	1,16	2,9	5,8

3.11 ANTICORPOS

3.11.1 Produção de anticorpos anti EF-Tu em camundongos

Previamente à imunização dos camundongos com a proteína EF-Tu, realizou-se a sangria pelo plexo retro-orbital para obtenção de soro pré-imune, utilizado como controle negativo em alguns experimentos.

Camundongos BALB/c (4-6 semanas) fêmeas foram imunizadas via intraperitoneal com 5 µg de proteína EF-Tu recombinante e 50 µg de hidróxido de alumínio utilizado como adjuvante num volume final de 250 µL. Foram aplicados mais dois reforços com intervalos de 15 dias com a mesma preparação de proteína.

Uma semana após a última imunização os camundongos foram sangrados pelo plexo retro-orbital. O sangue coletado foi mantido a 37°C por 30 minutos, e após 30 a 40 segundos a 4°C, centrifugou-se por 15 minutos a 4°C e 1.100 g. O soro foi separado do sangue descartando-se o coágulo. Os tubos de sangue e soro foram submetidos a nova centrifugação sob as mesmas condições e tempo e, novamente, o sangue foi separado do soro, e o soro conservado a -20°C.

O soro imune foi analisado por ELISA para determinação dos títulos de anticorpos.

3.11.2 Determinação dos títulos de anticorpos

A proteína recombinante EF-Tu (0,5 µg/poço) foi imobilizada em placa de 96 poços (Costar) por 16 h a 4°C. A placa foi lavada 3 vezes com solução de lavagem. Os sítios não específicos de ligação foram bloqueados com solução de bloqueio por 2 h a 37°C. A placa foi lavada mais uma vez e os soros dos animais diluídos foram aplicados em diluições seriadas (1:50 até 1:104857600). A placa foi incubada por 1h a 37°C e novamente lavada 3 vezes com a mesma solução anterior. Realizou-se incubação por 1 h a 37 °C com anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000 em solução de diluição. A placa foi lavada novamente 3 vezes e a revelação com OPD foi feita por aproximadamente 5 min e foi interrompida com a solução de parada (H₂SO₄). A leitura da absorbância foi feita a 492 nm. O título de anticorpos foi considerado como a diluição do soro capaz de resultar em leitura de absorbância igual a 0,1 a 492 nm (AUSUBEL et al., 1990).

3.12 SORO HUMANO NORMAL

Coletou-se de 4-5 mL de sangue de doadores normais em tubos apropriados, sem anticoagulante, deixou-se a 37°C por uma hora e em seguida a 4°C por 1-2 horas. Centrifugou-se a 4°C com rotação de 1.100 g por 20 minutos. Por fim, descartou-se o coágulo e congelou-se o soro em alíquotas a -80°C.

3.13 PROTEÍNAS DO SISTEMA COMPLEMENTO, COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR, MOLÉCULAS DA CASCATA DE COAGULAÇÃO E ANTICORPOS

O soro humano não-imune (SHN) foi obtido de doadores saudáveis, conforme acima descrito. Os reguladores negativos do sistema complemento (Fator H e C4BP) foram purificados a partir de plasma humano e adquiridos comercialmente (Complement Technology). Fibronectina plasmática, fibronectina celular, colágeno I, laminina, colágeno IV, elastina, fibrinogênio e plasminogênio foram adquiridos

comercialmente (Sigma-Aldrich), assim como anticorpos específicos e conjugados (Calbiochem / Quidel / Sigma).

3.14 ENSAIOS DE LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA EF-Tu

3.14.1 Imunofluorescência

Uma suspensão de 250 µL de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 (densidade 1×10^8) foi imobilizada em lâminas Lab-Tek de oito poços (Nalge Nunc) e incubada a 30°C por 80 minutos. As bactérias não aderidas foram removidas cuidadosamente e as aderidas fixadas com paraformaldeído 2% diluído em PBS. As lâminas foram bloqueadas com suplemento do meio EMJH (rico em BSA). Os soros imune e pré-imune (controle negativo) foram adicionados na diluição 1:50 e incubou-se por 60 min a 30°C. Após três lavagens com PBS, anti-IgG de cabra conjugado com fluoresceína (Alexa Fluor 488 - Invitrogen / Molecular Probes) na diluição 1:500 foi adicionado e incubou-se por 45 min a 30°C. As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS e uma vez com água estéril. As câmaras foram removidas e as lâminas foram montadas com meio Vectashield contendo iodeto de propídio (Vector Laboratories). As imagens foram coletadas através de um microscópio confocal Zeiss (LSM-510 Meta).

3.14.2 Microscopia eletrônica

Os ensaios de microscopia eletrônica foram realizados pela colaboradora Dra. Cecília Abe, do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

Culturas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 cultivadas como descrito anteriormente foram fixadas com glutaraldeído 0,3% em PBS por um período de aproximadamente 30 minutos em temperatura ambiente. As preparações foram lavadas por três vezes (centrifugações a 2.300 g por 5 min) com PBS e bloqueadas

com PBS contendo 0,2% de BSA (PBS/BSA) por 30 min. Em seguida, as preparações foram incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente com os anticorpos primários anti-EF-Tu, anti-LigA/B (controle positivo) ou soro pré-imune (controle negativo), na diluição de 1:10 em PBS/BSA. Após três lavagens com PBS, as preparações foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em cabra, marcado com partículas de ouro coloidal - 10 nm (Sigma-Aldrich, Co., EUA), diluído 1:5 em PBS/BSA durante uma hora, a temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS e uma lavagem com água destilada, as preparações foram negativamente contrastadas com acetato de uranila a 2% em água. Para tanto, as preparações foram diluídas na proporção de 1:1 na solução contrastante e aplicadas sobre grades de níquel previamente revestidas com Formvar, sobre a qual foram deixadas por 2 minutos a temperatura ambiente. Após este período, o excesso de líquido foi retirado com papel de filtro, e as preparações secas ao ar. As preparações foram observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (LEO 906E - BmgH Microsystems Leica, Alemanha) a 80 kV.

3.15 ENSAIOS DE INTERAÇÃO DE EF-TU COM COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR E MOLÉCULAS DA CASCATA DE COAGULAÇÃO POR ELISA

Para avaliar a interação de EF-Tu com moléculas da cascata de coagulação e componentes de matriz extracelular, foram realizados ensaios de ELISA, fazendo-se curvas de interação dose/resposta.

Os componentes de matriz ou da cascata de coagulação (1 µg/poço) diluídos em PBS foram imobilizados em placas de 96 poços a 4°C por 18 horas. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T (0,05%) entre cada etapa que se segue. Os sítios não específicos de ligação foram bloqueados usando BSA 1% por 2 h a 37 °C. Após o bloqueio, os componentes foram incubados com proteínas recombinantes de *Leptospira*: EF-Tu, LigBC (utilizada como controle positivo de interação) e LIC11030 (utilizada como controle negativo) nas concentrações de 0-2 µM por 1 hora e 30 minutos a 37 °C. Após lavagens, os poços foram incubados com anti EF-Tu (1:5000), anti-LigBC (1:10000) ou anti-LIC11030 (1:10000) por 1 hora a 37 °C. Após este

período, segundo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000 foi adicionado e incubado por 1 hora a 37 °C. A revelação foi feita entre 5-10 min com solução de revelação OPD como substrato e H₂O₂ 30%, e interrompida com a solução de parada (H₂SO₄). A leitura da absorbância foi feita a 492 nm.

Para os ensaios de interação com plasminogênio os controles utilizados foram: LipL32 (controle positivo) e LIC10301 (controle negativo) e a diluição dos anticorpos anti-LipL32 e anti-LIC10301 (1:10000).

3.16 PAPEL DOS RESÍDUOS DE LISINA E DO NaCl NA INTERAÇÃO EF-Tu/PLASMINOGÊNIO

Para avaliar o papel dos resíduos de lisina e forças iônicas na interação entre EF-Tu e plasminogênio, EF-Tu recombinante de leptospira (1 µg) foi imobilizada na placa e após 2 lavagens com PBS, os sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 3% a 37 ° C por 2 horas. Os poços foram lavados mais 2 vezes com PBS-T e ácido aminocapróico (análogo dos resíduos de lisina) na concentração de 0-10 mM ou NaCl (0-400 mM) foram adicionado em conjunto com o plasminogênio (10 µg / mL). Após 3 lavagens com PBS-T, os poços foram incubados com anti plasminogênio (Sigma) produzido em coelho na diluição 1:1000 por 1 h a 37 °C. Após este período, adicionou-se anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Sigma) na diluição de 1: 5000 e incubou-se por 1 h a 37 °C. A revelação foi feita com OPD e interrompida com a solução de parada. A leitura da absorbância foi feita a 492 nm.

3.17 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO PLASMINOGÊNIO LIGADO A EF-Tu DE LEPTOSPIRA DE GERAR PLASMINA

As proteínas recombinantes de *Leptospira interrogans* EF-Tu, LipL32 (controle positivo), LIC10301 (controle negativo) e BSA foram imobilizadas em placas de 96 poços (1 µg/poço) e incubadas por 16-20 h a 4°C. Entre cada etapa que se segue

foram feitas 3 lavagens com PBS-T. Os sítios não específicos de ligação foram bloqueados usando BSA 3% por 2 h a 37 °C. Após bloqueio, as placas foram incubadas por 1 h com plasminogênio purificado (2 µg/poço). Em seguida foram adicionadas 3 U de Ativador de Plasminogênio Uroquinase (uPA) e 250 ng do substrato específico para plasmina (dicloridrato de D-Val-Leu-Lys p-nitroanilida), em um volume final de 100 µL. Uma incubação com plasminogênio + uPA + inibidor 1 do ativador de plasminogênio (PAI-1) foi usada como controle negativo. As leituras da absorbância foram feitas a 405 nm após 24 h.

3.18 CAPACIDADE DA PLASMINA GERADA SOBRE EF-Tu DE CLIVAR C3b

Para avaliar a capacidade da plasmina gerada sobre EF-Tu de clivar moléculas de C3b, 1 µg das proteínas EF-Tu e LIC10301 (controle negativo) diluídas em PBS foram imobilizadas em placas de 96 poços e incubadas por 16-20 h a 4°C. Os sítios não específicos de ligação foram bloqueados usando BSA 3% por 2 h a 37 °C. Após bloqueio, as placas foram incubadas com plasminogênio purificado (2 µg) (*Sigma*). Após lavagens com PBS-T, foram adicionados o ativador de plasminogênio tipo uroquinase uPA (3 U) e a proteína do complemento C3b (500 ng) com o objetivo de avaliar a capacidade da plasmina ativa gerada de clivar esta proteína do complemento. Os produtos de clivagem foram coletados em diferentes tempos (1, 3 e 5 h), submetidos a SDS-PAGE 12% sob condições redutoras e transferidos para membranas de nitrocelulose. Sítios de ligação inespecífica foram bloqueados com PBS-T contendo 10% de leite desnatado por 16 h a 4 °C. Após três lavagens com PBS-T as membranas foram incubadas por 1 h com anti-C3 policlonal (*Complement Technology*) feito em cabra na diluição de 1:5000 e seguidamente incubadas com anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase (*Sigma*) na diluição 1:10000. Após três lavagens com PBS-T foi feita a revelação por quimioluminescência com o kit ECL (West Pico Pierce).

3.19 CAPACIDADE DA PLASMINA GERADA SOBRE EF-Tu DE CLIVAR FIBRINOGENO

Para avaliar a capacidade da plasmina gerada sobre EF-Tu de clivar fibrinogênio, 1 µg de EF-Tu foi imobilizado em placa de 96 poços. Os sítios não específicos de ligação foram bloqueados usando BSA 3%. Plasminogênio (2 µg) foi adicionado e incubou-se por 1 h. Após lavagens com PBS-T, foram adicionados o ativador de plasminogenio tipo uroquinase uPA (3U) e fibrinogênio (500 ng). Os produtos de clivagem foram coletados em diferentes tempos (30, 60, 120 e 240 minutos) e submetidos a SDS-PAGE 12% sob condições redutoras e transferidos para membranas de nitrocelulose. Sítios de ligação inespecífica foram bloqueados com PBS-T contendo 10% de leite desnatado por 16 h a 4 °C. Após três lavagens com PBS-T as membranas foram incubadas com anti-fibrinogênio humano monoclonal que reconhece a cadeia α da molécula, produzido em camundongo na diluição de 1:3000 e seguidamente incubadas com anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição 1:5000. Após três lavagens com PBS-T foi feita a revelação por quimioluminescência com o kit ECL (West Pico Pierce). Controles negativos de interação omitindo-se uPA e / ou plasminogênio foram incluídos (tempos de 60 e 240 minutos).

3.20 ENSAIOS DE INTERAÇÃO DE EF-Tu COM REGULADORES DO SISTEMA COMPLEMENTO POR *WESTERN BLOT* COM SOBREPOSIÇÃO

Proteínas recombinantes de *Leptospira* (EF-Tu, LigBC e LIC10301) foram submetidas a SDS-PAGE 12% em condições não redutoras e transferidas para membranas de nitrocelulose. Os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados com leite desnatado 10% em PBS-T por 18 h a 4 °C. Após três lavagens com PBS-T as membranas foram incubadas por 1 h e 30 min a temperatura ambiente com soro humano normal 7% como fonte de FH ou com C4BP purificado. Após cinco lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas por 60 min com anti-FH (*Quidel*) feito em cabra na diluição 1:10000 ou anti-C4BP (*Calbiochem*) feito em coelho na diluição

1:5000. Três lavagens com PBS-T foram realizadas e as membranas incubadas com anti-IgG de cabra ou anti-IgG de coelho conjugados a peroxidase (Sigma) nas diluições 1:10000 e 1:5000 respectivamente, por 1 hora a temperatura ambiente e sob agitação. Após três lavagens com PBS-T, foi feita a revelação por quimioluminescência (ECL- West Pico Pierce).

3.21 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CO-FATOR DE FH E C4BP LIGADOS A EF-Tu

A atividade de co-fator de FH ou C4BP ligados à proteína recombinante EF-Tu de *Leptospira* foi avaliada pela clivagem de C3b ou C4b, pelo Fator I. Um micrograma das proteínas EF-Tu, LigBC (controle positivo) e LIC10301 (controle negativo) diluídas em PBS foram imobilizadas em placas de 96 poços. A placa foi lavada duas vezes com PBS-1X e logo após os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados usando BSA 3%. Após bloqueio, a placa foi lavada 1 vez com PBS-1X, e as proteínas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos a 37 °C com 2 µg de FH ou C4BP purificados. Cinco lavagens com PBS-1X foram feitas e, a seguir, os poços foram incubados por períodos de 1, 2 ou 4 h a 37 °C com 250 ng de C3b ou C4b e 250 ng de FI (*Complement Technology, Inc*) diluídos em PBS-1X.

Após incubação, as amostras foram coletadas nos seus devidos tempos e analisadas por SDS-PAGE 12% em condições redutoras com o objetivo de avaliar a clivagem de C3b ou C4b. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e sítios não específicos de ligação foram bloqueados com solução de bloqueio por 18h a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T. Os fragmentos gerados após clivagem pelo Fator I foram detectados usando-se anticorpo policlonal anti-C3 (*Complement Technology, Inc*) na diluição 1:10000 em uma solução de leite desnatado 5% em PBS-T ou anticorpo monoclonal anti-C4d (*Quidel*) na diluição 1:1000 em PBS-T, respectivamente. Subsequentemente, as membranas foram lavadas com PBS-T mais três vezes e incubadas por 60 min a temperatura ambiente e sob agitação com anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase (*Sigma*) na diluição 1:10000 em leite desnatado 5% em PBS-T ou anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (*Sigma*) na diluição de 1:5000 em PBS-T. Ambos os anticorpos foram detectados por quimioluminescência com o *kit* ECL (*West Pico, Pierce*).

3.22 AVALIAÇÃO DA CONSERVAÇÃO DE EF-Tu EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEPTOSPIRA* (IMMUNOBLOTTING)

Extratos de *Leptospira* foram submetidos a SDS-PAGE 12% em condições redutoras e transferidos para membrana de nitrocelulose. Os sítios não específicos de ligação foram bloqueados com 10% de leite desnatado em PBS-T por 18 horas a 4 °C. Três lavagens com PBS-T foram realizadas e a membrana foi incubada com anti-EF-Tu produzido em camundongo na diluição 1:1000 por 1 hora a 37°C. Após 3 lavagens com PBS-T a membrana foi incubada com anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (*Sigma*) na diluição 1:5000 por 1 hora a 37°C. Depois de 3 lavagens com PBS-T foi feita a revelação por quimioluminescência (Kit ECL, *West Pico, Pierce*).

3.23 ENSAIO DE IMUNOPROTEÇÃO EM MODELO ANIMAL (HAMSTER)

Este ensaio foi realizado pela colaboradora Dra. Patrícia Antônia Estima Abreu (Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan) no Laboratório de Zoonoses Bacterianas (FMVZ-USP).

Grupos de dez hamsters com quatro semanas de idade foram imunizados por via subcutânea com 50 µg de proteínas recombinantes (LigAC ou EF-Tu), com PBS ou com 1×10^8 leptospiros mortas pelo calor (56 ° C durante 1 h) com hidróxido de alumínio (Alhydrogel), utilizado como adjuvante. O fragmento carboxiterminal da LigA (LigAC) foi incorporado nos ensaios como controle positivo, uma vez que confere de 70-100% de proteção em modelo animal (SILVA et al., 2007). Os animais receberam reforços depois de 14 dias com a mesma preparação antigênica. No 28º dia os hamsters foram desafiados por via intraperitoneal com 2×10^5 leptospiros (*L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130), correspondendo a 1000 vezes a dose letal de 50%, calculada pelo método de Reed-Muench (REED, 1938). Os animais que sobreviveram após 21 dias foram considerados protegidos.

4 RESULTADOS

4.1 CLONAGEM DO GENE QUE CODIFICA EF-Tu (LIC12875) NO VETOR pGEM-T easy

O gene EF-Tu foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *Leptospira interrogans* Copenhageni estirpe 10A e o produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%. Um fragmento de 1206 pares de bases correspondendo ao gene inteiro foi devidamente amplificado (figura 5).

Figura 5 - Amplificação do gene EF-Tu por PCR

Legenda: Fragmento amplificado por PCR a partir de DNA genômico de *L. interrogans* Copenhageni. Gene LIC12875 (1206 pb) *M - marcador de massa molecular (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen). pb – Pares de base

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

Os fragmentos foram purificados do gel utilizando o kit PureLink (Quick Gel Extraction Kit) da Invitrogen e clonado no vetor pGEM-T easy. Bactérias DH5 α foram transformadas com o produto de ligação e os clones recombinantes foram selecionados em placas LB-amp.

Para confirmação dos clones positivos foi utilizado o método fenol:clorofórmio (Figura 6), e destes clones selecionados foi extraído o DNA plasmidial para utilização nas etapas subsequentes.

Figura 6 - Seleção de construções plasmidiais positivas para o gene LIC12875 no vetor pGEM-T easy

Legenda: Seleção de construções plasmidiais positivas para o gene LIC12875 no vetor pGEM-T easy pelo método fenol-clorofórmio. 1-5 e 7 clones positivos, 8 e 9 clones sem inserto (vetor religado) e 10 vetor pGEM-T easy vazio (controle).

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

A presença dos insertos foi confirmada após digestão dos plasmídeos com enzima de restrição *EcoR*I e o resultado da digestão pode ser observado na figura 7.

Figura 7 - Análise dos plasmídeos pGEM-T contendo o inserto EF-Tu

Legenda: Plasmídeos pGEM-T Easy contendo insertos EF-Tu foram digeridos com enzima de restrição *EcoR* I. A banda de 3015 representa o vetor vazio e a de 1206, o inserto liberado. M - marcador de massa molecular (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen).

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

4.2 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES POSITIVOS

As construções obtidas foram sequenciadas com *primers* M13 F/R a fim de se verificar a eventual presença de mutações. Os clones sem mutações ou quaisquer alterações foram selecionados para as etapas subsequentes.

4.3 SUBCLONAGEM DO GENE QUE CODIFICA EF-Tu (LIC12875) NO VETOR DE EXPRESSÃO pAE

O gene LIC12875 clonado no vetor pGEM-t Easy foi transferido para o vetor de expressão pAE utilizando os sítios de restrição *Xho* I e *Hind* III. O vetor de expressão pAE é derivado do pRSET (*Invitrogen*) e possui código de iniciação seguido de código para 6 histidinas, para futura expressão da proteína recombinante com cauda de histidinas na posição N-terminal.

Para seleção de clones positivos utilizou-se o método fenol-clorofórmio (Figura 8). Após realização da extração do DNA plasmidial dos clones selecionados, procedeu-se à digestão com enzimas de restrição *Xho* I e *Hind* III e se confirmou a presença dos insertos subclonados, resultado este que pode ser visto na figura 9.

Figura 8 - Seleção de construções plasmidiais positivas para o gene LIC12875 no vetor pAE

Legenda: Seleção de construções plasmidiais positivas para o gene LIC12875 no vetor pAE pelo método fenol-clorofórmio. 1 – Vetor vazio (pAE), 2-15 – pAE/EF-Tu.
Fonte: Wolff, D. W. (2013)

Figura 9 - Análise dos plasmídeos contendo o inserto EF-Tu

Legenda: Vetor pAE (2800 pb) com os insertos liberados com enzimas de restrição *Xho* I e *Hind* III para obtenção de EF-Tu (1206 pb). M - marcador de massa molecular (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen).

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

4.4 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES POSITIVOS

As construções foram sequenciadas e na análise das sequências observou-se que nem todos os fragmentos haviam sido clonados corretamente. Portanto, os que apresentaram algum tipo de mutação ou qualquer outra alteração foram descartados e os clones que não apresentaram mutações foram selecionados. As colônias selecionadas foram preservadas a - 80°C em meio LB contendo 20% de glicerol estéril para futura expressão das proteínas recombinantes.

4.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE EF-Tu RECOMBINANTE

Bactérias *E.coli* BL21-SI foram transformadas com a construção plasmidial EF-Tu/pAE. As bactérias foram cultivadas a 30°C até se obter D.O_{600 nm} de 0,6 a 0,8. A indução da expressão de EF-Tu recombinante foi feita com NaCl (concentração final 200 mM). Após incubação de 3 horas, a cultura foi centrifugada e ressuspendida em PBS 1 X. As bactérias foram lisadas por sonicação e, através de centrifugação, foi possível separar as frações solúvel e insolúvel.

A expressão de EF-Tu recombinante foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e pode ser observada na figura 10. A expressão de EF-Tu foi bem sucedida e a proteína recombinante foi encontrada de forma majoritária na porção insolúvel em forma de corpúsculos de inclusão. O acúmulo de proteínas em corpúsculos de inclusão é uma característica marcante do sistema de expressão de proteínas em *E. coli*. Apesar da alta concentração proteica na fração insolúvel, pôde-se também observar presença da proteína na porção solúvel. A proteína EF-Tu recombinante expressa apresentou tamanho esperado (figura 10).

A eluição da proteína recombinante EF-Tu da fração solúvel foi feita com soluções contendo 60, 100 mM ou 1 M de imidazol como agente competidor. A fração eluída com 1 M de imidazol apresentou maior concentração proteica e menor presença de contaminantes (Figuras 10 e 11).

Figura 10 - Análise da expressão e purificação de EF-Tu expressa na fração solúvel

Legenda: Análise da expressão e purificação de EF-Tu (solúvel) por cromatografia de afinidade a níquel em SDS-PAGE 12%. (1) Controle não induzido; (2) Controle induzido; (3) Células não lisadas; (4) Fração solúvel; (5) Fração insolúvel; (6) Fração eluída com imidazol 60 mM; (7) Fração eluída com imidazol 100 mM. M- marcador de massa molecular (LMW).

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

Figura 11 - Análise da purificação de EF-Tu expressa na fração solúvel

Legenda: Análise da purificação de EF-Tu (solúvel) por cromatografia de afinidade a níquel em SDS-PAGE 12%. (1-9) Eluições com imidazol 1 M.

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

Da mesma forma, a eluição da proteína recombinante internalizada nos corpúsculos de inclusão foi feita com soluções contendo 40, 60, 100 mM ou 1 M de imidazol como agente competidor. A fração eluída com 1 M de imidazol apresentou maior concentração proteica e menor presença de contaminantes. A análise da purificação de EF-Tu presente nos corpúsculos de inclusão foi feita por SDS-PAGE e pode ser observada nas figuras 12 e 13.

Figura 12 - Análise da purificação de EF-Tu expressa na fração insolúvel

Legenda: Análise da purificação de EF-Tu (insolúvel) por cromatografia de afinidade a níquel em SDS-PAGE 12%. (1) Lavagem com 5 mM de imidazol; (2) Lavagem com 20 mM de imidazol; (3) Fração eluída com 40 mM de imidazol; (4) Fração eluída com 60 mM de imidazol; (5) Fração eluída com 100 mM de imidazol; (6 e 7) Eluição com 1 M de imidazol. M- marcador de massa molecular (LMW).

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

Figura 13 - Análise da purificação de EF-Tu expressa na fração insolúvel

Legenda: Análise da purificação de EF-Tu (insolúvel) por cromatografia de afinidade a níquel em SDS-PAGE 12%. (1-9) Eluições com imidazol 1 M.

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA EF-Tu RECOMBINANTE

A concentração da proteína EF-Tu recombinante foi estimada por dois métodos distintos (Bradford e análise em gel com curva de LMW). As concentrações estimadas das diferentes amostras de proteína recombinante foram:

EF-Tu (Sobrenadante mais concentrada) - 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

EF-Tu (Sobrenadante menos concentrada) - Não detectada

EF-Tu (*Pellet* mais concentrada) - 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

EF-Tu (*Pellet* menos concentrada) - 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

4.7 PRODUÇÃO DE ANTI EF-Tu EM CAMUNDONGOS

Três imunizações realizadas com intervalos de 15 dias foram feitas em camundongos BALB/c fêmeas com seis semanas de idade. Foram feitas duas coletas de sangue: uma antes das imunizações para obtenção de soro pré-imune e outra 15 dias após a última imunização para obtenção do soro imune. Os soros foram preparados após cada sangria e analisados por ELISA para obtenção dos títulos de anticorpos (Gráfico 1).

Gráfico 1: Determinação do título de anticorpos anti EF-Tu produzidos em camundongo.

Legenda: Títulos de anticorpos anti EF-Tu: foram realizadas três imunizações com intervalos de 15 dias. O soro pré-imune foi utilizado como controle. A determinação dos títulos de anticorpos foi feita por ELISA e observa-se que EF-Tu foi capaz de induzir a produção de anticorpos IgG específicos.

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

O soro imune apresentou um título de anticorpos de aproximadamente 1:102400. Portanto, a proteína EF-Tu é imunogênica. Estes anticorpos foram utilizados como ferramentas de análise em ensaios posteriores.

4.8 LOCALIZAÇÃO CELULAR DE EF-TU EM *LEPTOSPIRA*

Proteínas que supostamente desempenham múltiplas funções podem apresentar mais de uma localização celular. Para avaliar se EF-Tu está associada à membrana de leptospira, foram realizados ensaios de imunofluorescência e microscopia eletrônica com bactérias intactas. Os resultados revelaram que EF-Tu nativa foi reconhecida pelo soro produzido em camundongo imunizado com a proteína recombinante, como mostra a figura 14. Como controle positivo, utilizou-se soro policlonal produzido em camundongo capaz de reconhecer a porção amino-terminal conservada comum às proteínas LigA e LigB (α -LigA/B). As proteínas Lig foram previamente caracterizadas como proteínas de superfície de *Leptospira* (MATSUNAGA et al., 2003). Como controle negativo utilizou-se soro pré-imune. Conforme esperado, observou-se marcação apenas no controle positivo. A marcação com iodeto de propídeo ocorreu em todas as situações, indicando a presença de espiroquetas nas lâminas (Figura 14).

Figura 14 - Localização celular de EF-Tu em *Leptospira interrogans* por imunofluorescência de superfície.

Legenda: Localização celular de EF-Tu em *Leptospira interrogans*. Leptospiras intactas foram incubadas com soro pré-imune, anti-EF-Tu ou anti-LigA / B de camundongo. Anti-IgG de cabra conjugado à fluoresceína (Alexa Fluor 488) foi usado para detectar anticorpos ligados. O iodeto de propídeo (painéis à direita) foi usado para demonstrar a presença de leptospiras nas lâminas. Microscópio confocal Zeiss (LSM-510 Meta).

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

A localização de EF-Tu na superfície de *L. interrogans* foi comprovada por microscopia eletrônica. Partículas de ouro coloidal foram consistentemente observadas quando se utilizou soro anti-EF-Tu, ao passo que os organismos incubados com soro pré-imune não apresentaram marcação (Figura 15).

Figura 15 – Localização celular de EF-Tu por microscopia eletrônica

Legenda: Leptospiras foram incubadas com anti-EF-Tu, ou soro pré-imune de camundongo e com anti-IgG de camundongo conjugado a ouro coloidal. A análise foi realizada usando um microscópio de transmissão de elétrons (LEO 906E - Leica Microsystems BmgH, Alemanha).

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

4.9 INTERAÇÃO DE EF-Tu COM COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR E MOLÉCULAS DA CASCATA DE COAGULAÇÃO

Uma vez que EF-Tu localiza-se na membrana de leptospira, decidiu-se avaliar sua interação com moléculas do hospedeiro como moléculas da cascata de coagulação e da matriz extracelular.

Os ensaios de interação foram realizados por ELISA. Os diversos componentes (colágenos I e IV, elastina, laminina, fibronectinas plasmática e celular, fibrinogênio e plasminogênio) foram imobilizados em placas de 96 poços e concentrações crescentes de proteína (0-2 μ M) foram adicionadas aos poços. As proteínas aderidas foram detectadas com anti-soros específicos. Como controle positivo, utilizou-se a porção C-terminal da proteína LigB (LigBC), previamente descrita como ligante de várias proteínas da matriz extracelular (CHANG et al., 2007; CHOY et al., 2007; LIN; CHANG, 2008). Como controle negativo, utilizou-se a LIC11030, que não interage com os componentes testados. As proteínas LipL32 e LIC10301 foram usadas como controle positivo e negativo, respectivamente, nos ensaios envolvendo plasminogênio (VIEIRA et al., 2010).

Os gráficos 2 a 9 mostram que EF-Tu interage com todas as moléculas testadas, com exceção da fibronectina plasmática. Embora nesse caso também tenhamos observado uma diferença estatística em relação ao controle negativo, não consideramos essa interação relevante, uma vez que as D.Os obtidas foram muito baixas. As interações revelaram-se dose-dependentes e saturáveis.

Gráfico 2 – Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com colágeno do tipo I

Legenda: Colágeno do tipo I (1 μg/poço) diluído em PBS foi imobilizado em placas de 96 poços e posteriormente incubado com as proteínas recombinantes de *Leptospira*: EF-Tu, LigBC (controle positivo) e LIC11030 (controle negativo), nas concentrações de 0-2 μM. Após lavagens, os poços foram incubados com anticorpos específicos seguido do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os pontos representam a média e o desvio padrão da absorbância a 492 nm de dois experimentos independentes. Os valores de absorbância obtidos para as proteínas recombinantes EF-Tu e LigBC foram comparados àqueles observados com LIC11030 pelo teste t Student. * $p \leq 0,05$.

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

Gráfico 3 – Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com colágeno do tipo IV

Legenda: Colágeno do tipo IV (1 μg/poço) diluído em PBS foi imobilizado em placas de 96 poços e posteriormente incubado com as proteínas recombinantes de *Leptospira*: EF-Tu, LigBC (controle positivo) e LIC11030 (controle negativo), nas concentrações de 0-2 μM. Após lavagens, os poços foram incubados com anticorpos específicos seguido do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os pontos representam a média e o desvio padrão da absorbância a 492 nm de dois experimentos independentes. Os valores de absorbância obtidos para as proteínas recombinantes EF-Tu e LigBC foram comparados àqueles observados com LIC11030 pelo teste t Student. * $p \leq 0,05$

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

Gráfico 4 – Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com elastina

Legenda: Elastina (1 μg/poço) diluída em PBS foi imobilizada em placas de 96 poços e posteriormente incubada com as proteínas recombinantes de *Leptospira*: EF-Tu, LigBC (controle positivo) e LIC11030 (controle negativo), nas concentrações de 0-2 μM. Após lavagens, os poços foram incubados com anticorpos específicos seguido do anticorpo anti-IgG de camundongo

conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os pontos representam a média e o desvio padrão da absorbância a 492 nm de dois experimentos independentes. Os valores de absorbância obtidos para as proteínas recombinantes EF-Tu e LigBC foram comparados àqueles observados com LIC11030 pelo teste t Student. $*p \leq 0,05$

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

Gráfico 5 – Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com laminina

Legenda: Laminina (1 μg/poço) diluída em PBS foi imobilizada em placas de 96 poços e posteriormente incubada com as proteínas recombinantes de *Leptospira*: EF-Tu, LigBC (controle positivo) e LIC11030 (controle negativo), nas concentrações de 0-2 μM. Após lavagens, os poços foram incubados com anticorpos específicos seguido do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os pontos representam a média e o desvio padrão da absorbância a 492 nm de dois experimentos independentes. Os valores de absorbância obtidos para as proteínas recombinantes EF-Tu e LigBC foram comparados àqueles observados com LIC11030 pelo teste t Student. $*p \leq 0,05$

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

Gráfico 6 – Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com fibronectina plasmática

Legenda: Fibronectina plasmática (1 μg/poço) diluída em PBS foi imobilizada em placas de 96 poços e posteriormente incubada com as proteínas recombinantes de *Leptospira*: EF-Tu, LigBC (controle positivo) e LIC11030 (controle negativo), nas concentrações de 0-2 μM. Após lavagens, os poços foram incubados com anticorpos específicos seguido do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os pontos representam a média e o desvio padrão da absorbância a 492 nm de dois experimentos independentes. Os valores de absorbância obtidos para as proteínas recombinantes EF-Tu e LigBC foram comparados àqueles observados com LIC11030 pelo teste t Student. * $p \leq 0,05$

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

Gráfico 7 – Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com fibronectina celular

Legenda: Fibronectina celular (1 μg/poço) diluída em PBS foi imobilizada em placas de 96 poços e posteriormente incubada com as proteínas recombinantes de *Leptospira*: EF-Tu, LigBC

(controle positivo) e LIC11030 (controle negativo), nas concentrações de 0-2 μM . Após lavagens, os poços foram incubados com anticorpos específicos seguido do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os pontos representam a média e o desvio padrão da absorbância a 492 nm de dois experimentos independentes. Os valores de absorbância obtidos para as proteínas recombinantes EF-Tu e LigBC foram comparados àqueles observados com LIC11030 pelo teste t Student. $*p \leq 0,05$

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

Gráfico 8 – Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com fibrinogênio

Legenda: Fibrinogênio (1 $\mu\text{g/poço}$) diluído em PBS foi imobilizado em placas de 96 poços e posteriormente incubado com as proteínas recombinantes de *Leptospira*: EF-Tu, LigBC (controle positivo) e LIC11030 (controle negativo), nas concentrações de 0-2 μM . Após lavagens, os poços foram incubados com anticorpos específicos seguido do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os pontos representam a média e o desvio padrão da absorbância a 492 nm de dois experimentos independentes. Os valores de absorbância obtidos para as proteínas recombinantes EF-Tu e LigBC foram comparados àqueles observados com LIC11030 pelo teste t Student. $*p \leq 0,05$

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

Gráfico 9 – Análise da interação da proteína recombinante EF-Tu com plasminogênio

Legenda: Plasminogênio (1 µg/poço) diluído em PBS foi imobilizado em placas de 96 poços e posteriormente incubado com as proteínas recombinantes de *Leptospira*: EF-Tu, LipL32 (controle positivo) e LIC10301 (controle negativo), nas concentrações de 0-2 µM. Após lavagens, os poços foram incubados com anticorpos específicos seguido do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os pontos representam a média e o desvio padrão da absorbância a 492 nm de dois experimentos independentes. Os valores de absorbância obtidos para as proteínas recombinantes EF-Tu e LigBC foram comparados àqueles observados com LIC10301 pelo teste t Student. * $p \leq 0,05$

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

4.10 PAPEL DOS RESÍDUOS DE LISINA OU DE FORÇAS IÔNICAS NA LIGAÇÃO DE EF-TU AO PLASMINOGÊNIO

A interação de EF-Tu com plasminogênio foi analisada em maior profundidade, avaliando-se a participação de forças iônicas e/ou resíduos de lisina nessa ligação. Com esse objetivo, foram realizados ensaios de interação EF-Tu/plasminogênio na presença de quantidades crescentes de ácido aminocapróico (0-10 mM) ou NaCl (0-400 mM).

Aparentemente, os resíduos de lisina são relevantes para a interação plasminogênio/EF-Tu. A figura 16 mostra que 0,1 mM de ácido ϵ -aminocapróico já é suficiente para inibir parcialmente a ligação do plasminogênio ao EF-Tu.

Figura 16 – Análise do papel dos resíduos de lisina na ligação EF-Tu/Plasminogênio

Legenda: Papel dos resíduos de lisina na interação EF-Tu/plasminogênio. Plasminogênio (10 µg/ ml) foi adicionado a EF-Tu imobilizado na presença (0,1 - 10 mM) ou ausência de ácido ε-aminocapróico. O plasminogênio ligado foi detectado com um anticorpo monoclonal específico, e anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase. Cada ponto representa o valor da média de absorvância a 492 nm ± o desvio padrão de três experimentos independentes, cada um realizado em duplicata. (* $p < 0,05$).

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

Diferentemente dos resíduos de lisina, forças iônicas não estão envolvidas na ligação do plasminogênio a EF-Tu, uma vez que altas concentrações de NaCl não inibiram a referida interação (Figura 17).

Figura 17 – Papel de forças iônicas na ligação EF-Tu/plasminogênio

Legenda: Papel das forças iônicas na interação EF-Tu/plasminogênio. Plasminogênio (10 µg/ ml) foi adicionado a EF-Tu imobilizado na presença (25 – 400 mM) ou ausência de cloreto de sódio.

O plasminogênio ligado foi detectado com um anticorpo monoclonal específico, e anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase. Cada ponto representa o valor da média de absorbância a 492 nm $\pm$ o desvio padrão de três experimentos independentes, cada um realizado em duplicata.

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

4.11 PLASMINOGÊNIO LIGADO A EF-Tu É CONVERTIDO EM PLASMINA

Com o objetivo de avaliar se plasminogênio ligado a EF-Tu poderia ser convertido em plasmina, plasminogênio foi adicionado a EF-Tu imobilizado e, posteriormente, o ativador exógeno uPA e um substrato específico para plasmina (dicloridrato de D-Val-Leu-Lys p-nitroanilida) foram adicionados. Após 24 h, detectou-se a geração de plasmina, confirmada pela clivagem do substrato cromogênico, quando se utilizou EF-Tu e LipL32 (controle positivo). Não se observou clivagem do substrato na presença dos controles negativos LIC10301 e BSA. Os demais pontos apresentados na figura 20 representam controles adicionais. O resultado obtido neste ensaio está representado na figura 18.

Figura 18 – Plasminogênio ligado a EF-Tu é convertido em sua forma ativa (plasmina)

Legenda: Plasminogênio ligado a EF-Tu é convertido em plasmina funcionalmente ativa. As proteínas recombinantes ou BSA (10 ug / mL), imobilizadas em placas de microtitulação, foram incubadas com plasminogênio (20 ug / mL). Após lavagens, uPA (3 U) e o substrato cromogênico D-valil-leucil-lisina-p-nitroanilida dicloridrato (25 µg/poço) foram adicionados.

Os dados representam o valor médio de absorbância a 405 nm $\pm$ o desvio padrão de três experimentos independentes, cada um realizado em duplicata. (* $p < 0,05$). PLG (Plasminogênio), uPA (Ativador de plasminogênio tipo uroquinase), PAI-1 (inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1) e Sub (substrato)

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

4.12 PLASMINA GERADA SOBRE EF-TU CLIVA C3b

Além de possuir um papel na fibrinólise, demonstrou-se, recentemente, que a serinoprotease plasmina é capaz de degradar componentes do sistema complemento (BARTHEL; SCHINDLER; ZIPFEL, 2012).

Uma vez que a geração de plasmina sobre EF-Tu foi comprovada, sua atividade na clivagem de C3b, uma importante molécula de ativação do sistema complemento, foi avaliada. Para isso, as proteínas EF-Tu e LIC10301 (controle negativo) foram imobilizadas em placa de 96 poços e posteriormente incubadas com plasminogênio, uPA e C3b por 1, 3 e 5 horas. Após as incubações, os produtos de clivagem foram submetidos à eletroforese (SDS-PAGE 12%) e constatou-se que a cadeia α de C3b foi clivada em fragmentos de 68, 43 e 38 kDa pela plasmina ligada a EF-Tu. Além disso, pôde-se observar que a clivagem foi tempo dependente, sendo mais pronunciada no tempo de 5 horas ao passo que não se observaram fragmentos de clivagem no tempo de 1 hora (Figura 19). Não se observou clivagem de C3b quando se utilizou a proteína LIC10301, como esperado.

Figura 19 – Degradação de C3b pelo plasminogênio ativado (plasmina) ligado a EF-Tu

Legenda - Análise da atividade da plasmina sobre o C3b. As proteínas EF-Tu e LIC10301 (1 μ g) foram imobilizadas em placas e incubadas com plasminogênio (2 μ g) e/ou uPA (3 U) ou omitiram-se ambos (controles) e C3b (500 ng). A incubação foi feita por 1, 3 e 5 horas. Os fragmentos de clivagem foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida. Após transferência a detecção foi feita com anti-C3 policlonal. A molécula C3b foi clivada originando fragmentos de 68, 43 e 38 kDa. PLG (Plasminogênio), uPA (Ativador de plasminogênio tipo uroquinase).

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

4.13 PLASMINA GERADA SOBRE EF-TU DEGRADA FIBRINOGENO

O papel da plasmina gerada sobre EF-Tu sobre o substrato natural fibrinogênio também foi avaliado. EF-Tu foi imobilizada e incubada com plasminogênio. Fibrinogênio e uPA foram adicionados e incubou-se por 30, 60, 120 e 240 minutos. A cadeia α do fibrinogênio foi degradada de maneira tempo-dependente, sendo que pode-se observar a degradação total da mesma com 4 horas de incubação (Figura 20). Não se observou clivagem do fibrinogênio nos controles utilizados (quatro últimas canaletas).

Figura 20 – Degradação do fibrinogênio humano pela plasmina ligada a EF-Tu

Legenda: Plasminogênio (20 ug / ml) foi adicionado a EF-Tu (10 ug / ml) imobilizada. Após lavagens, fibrinogênio (500 ng) e uPA (3 U) foram adicionados, e a incubação prosseguiu durante os pontos de tempo indicados (30, 60, 120 ou 240 minutos). As amostras foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com um anticorpo monoclonal de camundongo que reconhece a cadeia α do fibrinogênio, seguido pelo anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado a peroxidase. Controles omitindo uPA ou plasminogênio foram incluídos. PLG (Plasminogênio), uPA (Ativador de plasminogênio tipo uroquinase).

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

4.14 INTERAÇÃO DE EF-Tu COM REGULADORES DO SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO

Segundo dados da literatura, a proteína EF-Tu de *Pseudomonas aeruginosa* interage com Fator H humano (KUNERT et al., 2007). Assim sendo, buscou-se investigar se EF-Tu de *Leptospira* também seria capaz de interagir com as proteínas reguladoras do sistema complemento FH e C4BP, podendo, assim, participar dos mecanismos de evasão desta bactéria ao sistema imune inato. A interação de EF-Tu com FH e C4BP foi analisada por *Western blot* com sobreposição (Figura 21).

A proteína recombinante de *Leptospira* EF-Tu e as proteínas utilizadas como controle negativo (LIC10301) e positivo (LigBC) foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE 12%) e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com soro humano normal (SHN) a 7%, como fonte de Fator H (utilizou-se soro porque a concentração sérica de FH é de aproximadamente 242-759 µg/mL; FERREIRA DE PAULA et al., 2003) ou com C4BP (2 µg) (molécula purificada). A detecção destas moléculas ligadas às proteínas recombinantes foi realizada com anti-FH humano produzido em cabra ou anti-C4BP produzido em coelho. Os resultados indicam que as proteínas EF-Tu e LigBC interagiram tanto com FH quanto com C4BP. A interação da proteína LigBC com FH e C4BP parece mais robusta que aquela observada por EF-Tu com estes reguladores.

Figura 21 – Interação de EF-Tu com Fator H e C4BP por *Western blot* com sobreposição

Legenda: Análise da interação de FH e C4BP com EF-Tu recombinante de *Leptospira* por *Western blot* com sobreposição. Após eletroforese em condições não redutoras, as proteínas recombinantes foram transferidas para membranas de nitrocelulose. A membrana foi incubada com 7% de NHS como fonte de FH ou com C4BP purificado. A detecção foi feita com anticorpos específicos. LigBC (56 kDa) e LIC10301 (13 kDa) foram incluídas como controles positivo e negativo, respectivamente.

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

4.15 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CO-FATOR DE FH E C4BP LIGADOS A EF-Tu

Com objetivo de se avaliar a funcionalidade de FH e C4BP ligados a EF-Tu, realizou-se ensaios de co-fator. EF-Tu e as proteínas controles LigBC e LIC10301 foram imobilizadas, incubadas com FH ou C4BP, e após lavagens, foram adicionados C3b (no caso de FH) ou C4b (no caso de C4BP) e FI. Incubou-se por 1, 2 ou 4 h.

Na figura 22 pode-se observar que o Fator H ligado a EF-Tu bem como à LigBC apresentou atividade co-fatora para que o Fator I clivasse a cadeia alfa da molécula de C3b gerando os fragmentos α' 68 e α' 43 kDa, já observados em trabalhos anteriores. FH ligado a LIC10301 não gerou clivagem de C3b, como esperado. As clivagens foram tempo-dependentes. Quando se omitiu FH nas incubações, não se observou clivagem de C3b, independentemente da proteína utilizada.

Figura 22 – Avaliação da atividade co-fatora de FH ligado a EF-Tu

Legenda - Análise da atividade de FH ligado a EF-Tu como co-fator de FI na clivagem de C3b. As proteínas EF-Tu, LigBC e LIC10301 (1 µg por poço) foram imobilizadas em placas e incubadas com FH purificado (2 µg) ou sem FH (controle negativo). C3b (500 ng) e FI (250 ng) foram adicionados após lavagem dos poços. A reação foi incubada por 1, 2 e 4 h a 37° C. Os produtos foram analisados por SDS-PAGE 10% e os fragmentos de clivagem de C3b foram detectados por *Western blot* com anti- C3 policlonal. Fragmentos de clivagem de 68 kDa e 43 kDa estão indicados à direita.

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

C4BP ligada à proteína EF-Tu não apresentou atividade co-fatora, uma vez que não foram detectados fragmentos de clivagem de C4b (dados não mostrados).

4.16 CONSERVAÇÃO DE EF-TU EM DIFERENTES SOROVARES DE *LEPTOSPIRA*

A presença de EF-Tu em diversos sorovares de *Leptospira* foi avaliada por *immunoblotting*. Uma banda de 43 kDa, correspondente ao tamanho esperado do EF-Tu nativo, foi observada em todos os sorovares testados (Panamá, Javanica, Tarassovi, Cynopteri, Copenhageni, Pomona e Shermani), e foi também observada na *L. biflexa* sorovar Patoc, uma estirpe não-patogênica. Pode-se concluir, portanto, que EF-Tu está universalmente distribuído entre as espécies de *Leptospira* (Figura 23).

Figura 23 - Análise da conservação de EF-Tu em diferentes espécies de *Leptospira* por *immunoblotting*

Legenda: Avaliação da conservação de EF-Tu por *immunoblotting* em diferentes espécies de *Leptospira*.
 (1) *Leptospira biflexa* sorovar Patoc; (2) *Leptospira noguchi* sorovar Panama; (3) *Leptospira borgpeterseni* sorovar Javanica; (4) *Leptospira borgpetersenii* sorovar Tarassovi; (5) *Leptospira kirshneri* sorovar Cynopteri; (6) *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni; (7) *Leptospira interrogans* sorovar Pomona; (8) *Leptospira santarosai* sorovar Shermani; (9) EF-Tu recombinante de *Leptospira*.

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

4.17 ENSAIO DE IMUNOPROTEÇÃO EM MODELO ANIMAL (HAMSTER)

Devido à sua ampla distribuição entre espécies de *Leptospira*, o potencial de EF-Tu como candidato vacinal foi avaliado e os resultados apontam que EF-Tu não conferiu proteção aos animais desafiados. O quadro 11 mostra os resultados obtidos no desafio.

Quadro 11 – Avaliação da eficácia protetora de EF-Tu em modelo animal (hamster)

Grupos	Sobrevivência ^b (%)	Cultura renal (Positivo/Sobreviventes)	Dia da morte de cada animal
Experimento 1			
Controle ^a	20	2/2	7,10,10,10,10,10, 17, 17
PBS	10	1/1	7,7,7,9,9,9,9,9,9
<i>Leptospiras</i> mortas por calor	100	0/10	-
LigAC	100	10/10	-
EF-Tu	50	2/5	7,7,10,10,11
Experimento 2			
Controle ^a	40	4/4	7,8,8,9,15,15
PBS	40	4/4	7,8,8,8,9,11
<i>Leptospiras</i> mortas por calor	100	0/10	-
LigAC	100	4/10	-
EF-Tu	30	2/3	8,8,8,9,12,15,15

Legenda: Ensaio de imunoproteção em modelo animal. Hamsters de quatro semanas foram imunizados com EF-Tu, LigAC, PBS, ou *Leptospiras* mortas por calor. Hidróxido de alumínio foi utilizado como adjuvante. LigAC foi utilizada como controle positivo. Os animais foram desafiados com 2×10^5 leptospiros e os animais sobreviventes depois de 21 dias foram considerados protegidos. ^a Hamsters que não foram imunizados, ^b Porcentagem calculada utilizando o número de animais sobreviventes / total de animais desafiados (dez animais por grupo),
 *Estatisticamente diferente do grupo controle (Fisher's exact test, P <0,05).

Fonte: Wolff, D. W. (2013)

5 DISCUSSÃO

O Fator de Elongação Tu é uma das mais abundantes e conservadas proteínas presente em diversos patógenos. Ela pertence a uma classe de proteínas chamadas de *moonlighting*, conhecidas por realizar múltiplas, porém, independentes funções, que não podem ser atribuídas a fusões de genes ou fragmentos proteolíticos que servem para diferentes atividades. Juntamente com a clássica função citoplasmática na síntese de proteínas, demonstrou-se neste estudo que EF-Tu de *Leptospira* executa funções adicionais, servindo, por exemplo, como receptor de superfície para moléculas do hospedeiro, como moléculas da cascata de coagulação, da matriz extracelular e do sistema complemento. Ainda não está claro como EF-Tu é ancorado na membrana externa de vários procariotos, mas demonstrou-se que esta localização de superfície permite a interação desses microrganismos com células hospedeiras e moléculas, tais como a fibronectina (DALLO et al., 2002; DALLO et al., 2012), plasminogênio (SCHAUMBURG et al., 2004; KUNERT et al., 2007), FH (KUNERT et al., 2007), mucinas e células intestinais humanas (GRANATO et al., 2004).

A colonização de órgãos-alvo por leptospiros patogênicos é favorecida pela sua capacidade de escapar de respostas do sistema imune inato (MERI et al., 2005; BARBOSA et al., 2009) e, posteriormente, por meio de sua habilidade para interagir com as células hospedeiras ou com a matriz extracelular (FRAGA et al., 2011). Os ensaios de imunofluorescência e microscopia eletrônica indicam fortemente que EF-Tu de *Leptospira* encontra-se na superfície da bactéria, além de sua clássica localização no citoplasma. Dada sua localização na superfície, questionou-se se essa proteína poderia também ser considerada uma proteína "*moonlighting*", contribuindo para o processo de colonização do hospedeiro.

De acordo com nossos resultados, EF-Tu medeia a interação da bactéria com a matriz extracelular, moléculas da cascata de coagulação e reguladores do sistema complemento, incluindo colágeno I e IV, fibronectina celular e plasmática, laminina, elastina, fibrinogênio, plasminogênio, Fator H e C4b Binding Protein (C4BP).

A matriz extracelular (MEC) é um complexo de macromoléculas (componentes fibrosos, proteínas e polissacarídeos) que se organizam formando uma rede proteica (ÖZBEK et al., 2010). A MEC fornece o suporte estrutural para as células

parenquimais nos tecidos, suporte para fixação epitelial de células endoteliais (KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011). Nos últimos anos estudos demonstraram que a MEC está envolvida na sinalização célula-célula, além de participar na regulação da proliferação, diferenciação e migração celular (LOCKHART et al., 2011).

As proteínas da MEC podem ser classificadas em dois grandes grupos: as proteínas estruturais (colágenos e elastina) e as adesivas (lamininas e fibronectinas).

As proteínas mais abundantes da MEC e, conseqüentemente, do corpo humano são os colágenos. Eles formam uma família de aproximadamente 26 membros encontrados em toda MEC. A função primária dos colágenos é fornecer apoio e possibilitar a ligação de outras proteínas da MEC (KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011). Além disso, desempenham papel importante na formação de tendões, cartilagem e ossos, proporcionando resistência para a pele, órgãos e músculos (HARRIS; SOLIAKOV; LEWIS, 2013). O colágeno do tipo I é comumente encontrado nos tendões, na cartilagem fibrosa, no tecido conjuntivo frouxo, no tecido conjuntivo denso (onde é predominante sobre os outros tipos), ossos e pele. O colágeno IV é produzido por células musculares e epiteliais e juntamente com a laminina, fibronectina, entactina e peptídeooglicanos, é constituinte importante da lâmina basal, a estrutura que delimita o tecido epitelial do conjuntivo (KANG; KRAMER, 2000).

A elastina é uma das proteínas estruturais da MEC. Trata-se de uma proteína elástica, insolúvel, encontrada predominantemente no tecido conjuntivo das artérias, da pele e do pulmão, além dos ligamentos, artérias e cartilagens. Predomina nos tecidos onde a elasticidade é de grande importância. Além da elasticidade, confere resistência (MACEWAN; CHILKOTI, 2009; RODRIGUÉZ-CABELLO et al., 2011).

Além das proteínas estruturais citadas acima, a MEC apresenta proteínas responsáveis pela adesão. As lamininas fazem parte desse grupo de proteínas e compreendem uma família de glicoproteínas encontrada predominantemente na membrana basal, juntamente com a fibronectina e colágeno do tipo IV. A laminina é vital para muitas funções fisiológicas. São essenciais para o início do desenvolvimento embrionário e organogênese e têm funções cruciais em diversos tecidos, incluindo músculos, nervos, pele, rim, pulmão, e sistema vascular (DURBEEJ, 2010).

Outra proteína adesiva é a fibronectina humana (FN), uma molécula de peso molecular elevado (440-500 kDa), abundante no plasma sanguíneo e em outros fluidos biológicos. Na circulação sanguínea a concentração de FN é cerca de 300-400 mg / L (LEMAŃSKA-PEREK et al., 2013). Existem duas formas principais de fibronectina: a plasmática e a celular. A fibronectina plasmática é uma proteína dimérica solúvel encontrada no plasma, secretada pelos hepatócitos e em menor grau por macrófagos, linfócitos, plaquetas e células endoteliais e pode participar de processos como a coagulação sanguínea, a cicatrização de feridas e fagocitose (KOHAN et al., 2010). A fibronectina celular é uma proteína insolúvel de forma multimérica secretada pelos fibroblastos ativados. Essas moléculas ficam ancoradas na superfície das células favorecendo a ligação de proteínas complementares, especialmente as integrinas (KOHAN et al., 2010).

Tem sido bem documentada ao longo das últimas décadas que a interação de patógenos com a MEC pode desempenhar um papel fundamental na colonização dos tecidos do hospedeiro, sendo utilizada assim como uma estratégia de invasão por diferentes patógenos.

A ligação a proteínas da MEC é uma estratégia bastante utilizada por patógenos, incluindo *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis*, para mediar contato com o hospedeiro. Além disso, alguns agentes patogênicos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* e *Porphyromonas gingivalis* secretam proteases ativas capazes de degradar a MEC, permitindo, assim, a penetração nas camadas mais profundas do tecido. Um fator crucial na patogênese da infecção por *Borrelia ssp.* é a ligação a proteínas da MEC do hospedeiro. Provavelmente, essa interação facilita a adesão e colonização, além de permitir a penetração desse agente nas camadas mais profundas do tecido e, consequentemente, na circulação, favorecendo a disseminação e colonização de vários órgãos e tecidos (HALLSTRÖM et al., 2010). Espécies patogênicas de *Leptospira* têm capacidade de aderir e disseminar-se rapidamente dentro do hospedeiro durante a fase inicial de infecção. Essa adesão está diretamente ligada à sua capacidade de interação com moléculas da MEC, e é considerada essencial na fase inicial da infecção (FRAGA et al., 2011).

Além de sua interação com moléculas da MEC, EF-Tu liga-se também a componentes da cascata de coagulação. O sistema de coagulação, juntamente com o sistema complemento, constitui uma primeira linha de defesa, objetivando estancar sangramentos e evitar a invasão de microorganismos. Muitos fatores de coagulação estão envolvidos nesse processo de reparo tecidual. Uma lesão tecidual estimula a geração de trombina, uma serino protease responsável pela clivagem do fibrinogênio e consequente formação de fibrina, a proteína fibrosa responsável pela formação do coágulo e subsequente estancamento sanguíneo (AMARA et al., 2008).

A cascata de coagulação conta com duas importantes proteínas, que desempenham papéis ativos nesse processo: o fibrinogênio e o plasminogênio. O fibrinogênio é uma glicoproteína solúvel sintetizada no fígado pelos hepatócitos e desempenha um papel importante na coagulação sanguínea. Ele possui no plasma uma concentração de cerca de 2 a 4,5 mg / mL e também está presente em quantidades substanciais nas plaquetas. O fibrinogênio é composto por três cadeias polipeptídicas diferentes (α , β e γ) ligadas uma a outra por pontes dissulfeto. Os pesos moleculares individuais das três cadeias são de aproximadamente $A\alpha$ 63,5 kDa, $B\beta$ 56 kDa, e γ 47 kDa e sua massa molecular total é estimada em 340 kDa (HALKIER, 1991). Quando clivada pela trombina, a molécula de fibrinogênio gera fibrina, um componente estrutural essencial dos coágulos, impedindo assim, a perda de sangue (ADAMCZYK et al., 2013). Fibrinogênio também está associado a diversas patologias, como a trombose, hemorragia, e cancro (RAYNAL et al., 2013).

Outra importante molécula da cascata de coagulação é o plasminogênio, uma glicoproteína de cadeia única que circula no plasma como zimogênio da plasmina, uma enzima responsável pela clivagem da fibrina. A sua massa molecular é estimada em 92 kDa e sua concentração no plasma humano normal é de cerca de 200 μ g/mL (HALKIER, 1991). O plasminogênio participa ativamente do processo fibrinolítico. A fibrinólise é um processo de regulação fisiológica e consiste na quebra da fibrina para limitar a coagulação e para resolver os coágulos sanguíneos, evitando a formação de trombos. O sistema fibrinolítico se inicia com a conversão do plasminogênio em plasmina, uma serino-protease potencialmente capaz de degradar fibrina, fibrinogênio, Fator V e Fator VIII (AMARA et al., 2008).

A abordagem proteômica empregando extratos de proteína total de *L. interrogans* já havia identificado EF-Tu como um ligante de plasminogênio (VIEIRA et al., 2012), o que nos levou a aprofundar a caracterização dessa interação. Segundo nossos achados, EF-Tu de *Leptospira* se liga ao plasminogênio humano de forma dose-dependente. A adição de ácido ϵ -aminocapróico reduziu a interação entre EF-Tu e plasminogênio, sugerindo que resíduos de lisina apresentam um papel importante nesta ligação. Por outro lado, forças iônicas não parecem desempenhar papel significativo na interação entre EF-Tu e plasminogênio, uma vez que diferentes concentrações de NaCl não interferiram na ligação.

O plasminogênio, presente tanto na fase fluida como sobre superfícies, é acessível a seus ativadores, como uPA. Uma vez ativado, plasminogênio é convertido em plasmina, uma serino-protease capaz de clivar moléculas do sistema complemento e da cascata de coagulação. Tanto o sistema complemento quanto a cascata de coagulação desempenham papel importante na interação patógeno/hospedeiro e na resposta infecciosa do hospedeiro, sendo capazes de iniciar e/ou mediar uma resposta inflamatória em resposta a uma lesão tecidual. É função desses sistemas proteger o hospedeiro contra infecções por patógenos. A regulação da progressão de ambas as cascatas pode ser diretamente afetada pela plasmina, uma vez que esta é capaz de clivar e inativar as principais moléculas desses sistemas (VIEIRA et al., 2011; BARTHEL; SCHINDLER; ZIPFEL, 2012).

Nossos resultados demonstraram que uma vez ligado a EF-Tu, o plasminogênio foi convertido em plasmina, funcionalmente ativa, a qual, por sua vez, clivou C3b, gerando iC3b, forma inativa da molécula de C3b que perde sua capacidade de ativar qualquer via do complemento. Além disso, a plasmina gerada também pode ajudar a disseminação bacteriana através da degradação da cadeia α de fibrinogênio, um substrato natural. Através dessas ações, a plasmina favorece a sobrevivência bacteriana dentro do hospedeiro por mais tempo, aumentando as chances de colonização e instalação da doença.

A ativação do sistema complemento é necessária para contenção da infecção. Porém, faz-se necessária uma regulação estrita deste sistema para evitar ação contra o próprio organismo e o consumo exagerado de moléculas do complemento. Essa regulação é feita por proteínas que podem estar ancoradas na membrana de alguns

tipos celulares ou solúveis no plasma. O Fator H (FH) é uma proteína solúvel, de 150 kDa, responsável pela regulação da ativação da via alternativa do complemento. Ele inibe a ativação desta via através da prevenção da ligação do Fator B a C3b, acelerando o decaimento da C3-convertase (C3bBb) e agindo como um co-fator para a clivagem de C3b pelo Fator I (FI) (WHALEY; RUDDY, 1976; PANGBURN ; SCHREIBER; MÜLLER-EBERHARD, 1977). EF-Tu de *Leptospira* é capaz de interagir com FH, e este permanece ativo, sendo capaz de atuar como um co-fator, conforme indicado pela presença de fragmentos de clivagem de C3b, após incubação com FI. Portanto, através da interação com plasminogênio e FH, EF-Tu de *Leptospira* contribui para a evasão imune da bactéria, inibindo a ação do sistema complemento.

C4b-binding protein (C4BP) é uma proteína solúvel, composta por múltiplas cadeias α (70 kDa) associadas a uma única cadeia β (45 kDa). Sua forma mais comumente encontrada no plasma humano é composta por sete cadeias α idênticas associadas à cadeia β . C4BP tem como função a regulação das vias clássica e das lectinas do complemento. Acelera o decaimento funcional da C3-convertase e atua como co-fator para o Fator I clivar C4b (CALICH; VAZ, 2009). Nossos resultados demonstraram que C4BP, assim como FH, foi capaz de se ligar a EF-Tu, porém não permaneceu ativo e, conseqüentemente, não apresentou atividade co-fatora para FI clivar C4b.

EF-Tu é amplamente distribuído entre diferentes sorovares de *Leptospira*, incluindo *L. biflexa* sorovar Patoc, uma estirpe não patogênica. Em *Pseudomonas aeruginosa* EF-Tu interage com FH e plasminogênio e foi identificada na superfície da cepa SG137, que é sensível à atividade bactericida do soro sendo, portanto, lisada pelo sistema complemento (KUNERT et al., 2007). A presença de EF-Tu em bactérias patogênicas não deve garantir por si só sua sobrevivência no hospedeiro, porque a maioria dos agentes patogênicos possuem múltiplas estratégias de evasão eficiente favorecendo sua colonização. Espécies de *Leptospira* possuem proteínas de membrana externa, como por exemplo, LenA, LenB, LigA, LigB e LcpA (STEVENSON et al., 2007; BARBOSA et al., 2010; VERMA et al., 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012) que se ligam a FH e / ou C4BP, auxiliando, assim, o controle da ativação do complemento na superfície bacteriana. Além disso, secretam proteases que clivam as principais proteínas do complemento das três vias, conferindo deste modo, vantagem de sobrevivência no hospedeiro.

Dado o grau de conservação desta proteína entre diversas espécies de *Leptospira*, sua utilidade como um candidato vacinal foi avaliada. EF-Tu não induziu proteção em hamsters desafiados com doses letais de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130.

A caracterização funcional de EF-Tu de *Leptospira*, bem como a identificação de moléculas hospedeiras com as quais essa proteína é capaz de interagir, pode contribuir para compreensão dos mecanismos de evasão imune utilizados por leptospiros patogênicos, auxiliando assim no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que impeçam essa interação e, conseqüentemente, a evasão desse patógeno, propiciando sua eliminação pelo sistema imune inato.

Em conclusão, nós identificamos EF-Tu como uma proteína *moonlighting* em *Leptospira*. Quando exibida na superfície da bactéria, EF-Tu liga-se a múltiplas proteínas do hospedeiro. Assim sendo, pode contribuir para a invasão de tecidos e inativação do sistema complemento. Esta é a primeira descrição de uma proteína *moonlighting* em *Leptospira*.

6 CONCLUSÕES

- Em *Leptospira*, EF-Tu está presente tanto no citoplasma (localização clássica) quanto ancorado à membrana.
- EF-Tu recombinante de *Leptospira* interage com moléculas do sistema fibrinolítico (plasminogênio e fibrinogênio) e com moléculas da matriz extracelular (colágenos I e IV, laminina, elastina e fibronectinas plasmática e celular).
- Resíduos de lisina apresentam papel importante na ligação entre EF-Tu e plasminogênio.
- Plasminogênio ligado a EF-Tu é convertido em sua forma ativa, a plasmina, na presença do ativador exógeno uPA.
- Plasmina gerada sobre EF-Tu é capaz de clivar C3b, gerando iC3b (forma inativa da molécula C3b), favorecendo a evasão imune ao sistema imune inato pela bactéria *Leptospira*.
- Plasmina gerada sobre EF-Tu apresenta capacidade de degradação da cadeia α do fibrinogênio, contribuindo para o processo de colonização do hospedeiro por leptospiros.
- EF-Tu presente na superfície de *Leptospira* interage com Fator H e C4BP, principais reguladores solúveis das vias alternativa, clássica e das lectinas do sistema complemento humano.
- Fator H ligado a EF-Tu permanece ativo, atuando como co-fator para clivagem de C3b pelo Fator I, auxiliando assim a evasão imune de leptospiros ao sistema imune inato do hospedeiro.
- EF-Tu é amplamente conservado em diferentes espécies de *Leptospira*.

- EF-Tu não induziu proteção em hamsters desafiados com doses letais de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130.

REFERÊNCIAS

- ABDULKADER, R. C. R. M.; SILVA, M. V. The kidney in leptospirosis. **Pediatric Nephrology**, v. 23, p. 2111-2120, 2008.
- ADAMCZYK, B.; STRUWE, W. B.; ERCAN, A.; NIGROVIC, P. A.; RUDD, P. M. Characterization of fibrinogen glycosylation and its importance for serum/plasma N-glycome analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 12, p. 444-454, 2013.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, p. 287-296, 2010.
- ADLER, B.; LO, M.; SEEMANN, T.; MURRAY, G. L. Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. **Veterinary Microbiology**, v. 153, p. 73-81, 2011.
- AMARA, U.; RITTIRSCH, D.; FLIERL, M.; BRUCKNER, U.; KLOS, A.; GEBHARD, F.; LAMBRIS, J. D.; HUBER-LANG, M. Interaction between the coagulation and complement system. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 632, p. 71-79, 2008.
- ATZINGEN, M. V.; BARBOSA, A. S.; DE BRITO, T.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; LIMA, D. M.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BioMed Central Microbiol**, v. 8, n. 70, p. 1-16, 2008.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STHRUL, K. Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons, 1990.
- BALASUBRAMANIAN, S.; KANNAN, T. R.; BASEMAN, J. B. The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumonia* elongation factor-Tu interacts with fibronectin. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3116-3123, 2008.
- BALLARD, S. A.; WILLIAMSON, M.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. Interactions of virulent and avirulent leptospires with primary cultures of renal epithelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, v. 21, p. 59-67, 1986.
- BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; NEVES, F. O.; ATZINGEN, M. V.; WATANABE, M. M.; VIEIRA, M. L.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infect and Immunity**, v. 74, p. 6356-6364, 2006.
- BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; SILVA, A. S.; DAHA, M. R.; ISAAC, L. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infect and Immunity**, v. 77, p. 1137-43, 2009.

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

BARTHEL, D.; SCHINDLER, S.; ZIPFEL, P. F. Plasminogen is a complement inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 18831-18842, 2012.

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

BERRIER, C.; GARRIGUES, A.; RICCHARME, G.; GHAZI, A. Elongation Factor-Tu and DnaK are transferred from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli* during osmotic downshock presumably via the mechanosensitive channel **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 248-251, 2000.

BEUKEN, E.; VINK, C.; BRUGGEMAN, C. A. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. **Biotechniques**, v. 24, n.5, p. 48-50, 1998.

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

CALDAS, T. D.; EL YAAGOUBI, A.; RICCHARME, G. Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 11478-11482, 1998.

CALICH, V.; VAZ, C. *Imunologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2009. p. 104.

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

CHANG, Y. F.; CHEN, C. S.; PALANIAPPAN, R. U.; HE, H.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; YAN, W.; FAISAL, S. M.; PAN, M. J.; CHANG, C. F. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. **Vaccine**, v. 25, n. 48, p. 8190-8197, 2007.

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

CINCO, M.; BANFI, E. Activation of complement by leptospires and its bactericidal activity. **Zentralblatt Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene**, v. 254, p. 261-265, 1983.

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

CLARK, B. F. C.; NYBORG, J. The ternary complex of EF-Tu and its role in proteinbiosynthesis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, p.110-116, 1997.

COPLEY, S. D. Moonlighting is mainstream: paradigm adjustment required. **Bioessays**, v. 34, p. 578-588, 2012.

DALLO, S. F.; KANNAN, T. R.; BLAYLOCK, M. W.; BASEMAN, J. B. Elongation Factor-Tu and E1 betasubunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. **Molecular Microbiology**, v. 46, p.1041-1051, 2002.

DALLO, S. F.; ZHANG, B.; DENNO, J; HONG, S.; TSAI, A.; HASKINS, W.; YE, J. Y.; WEITAO, T. Association of *Acinetobacter baumannii* EF-Tu with cell surface, outer membrane vesicles, and fibronectin. **Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

DURBEEJ, M. Laminins. **Cell andTissue Research**, v. 339, p. 259–268, 2010.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. *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.

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

FERREIRA DE PAULA, P.; BARBOSA, J. E.; JUNIOR, P. R.; FERRIANI, V. P. L.; LATORRE, M. R. D. O.; NEDELMANN, V.; ISAAC, L. Ontogeny of complement regulatory proteins – concentrations of factor H, factor I, C4b-binding protein, properdin and vitronectin in healthy children of different ages and adults. **Scand Journal Immunology**, v. 58, p. 572-577, 2003.

FRAGA, T. R.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scandinavian Journal Immunology**, v. 73, p. 408-419, 2011.

GRANATO, D.; BERGONZELLI, G. E.; PRIDMORE, R. D.; MARVIN, L.; ROUVET, M.; CORTHÉSY-THEULAZ, I. E.; Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. **Infect and Immunity**, v. 72, p. 2160-2169, 2004.

GROSS, S. R.; KINZY, T. G. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, p. 772-778, 2005.

GUERRA, M. A. Leptospirosis. **Veterinary Medical Today: Zoonosis Update**, v. 234, n. 4, p. 472-478, 2009.

HALKIER, T. **Mechanisms in blood coagulation fibrinolysis and the complement system**. New York: Cambridge University Press, 1991.

HALLSTRÖM, T.; HAUPT, K.; KRAICZY, P.; HORTSCHANSKY, P.; WALLICH, R.; SKERKA, C.; ZIPFEL, P. F. Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen. **Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 3, p. 490-498, 2010.

HARRIS, J. R.; SOLIAKOV, A.; LEWIS, R. J. In vitro fibrillogenesis of collagen type I in varying ionic and pH conditions. **Micron and microscopy acta**, v. 49, p. 60-68, 2013.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 494-501, 2011.

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

HENDERSON, B.; MARTIN, A. Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 9, p. 3476-3491, 2011.

HOKE, D. E.; EGAN, S.; CULLEN, P. A.; ADLER, B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infect and Immunity**, v. 76, p. 2063-2069, 2008.

HUBERTS, D. H. E.W.; VAN DER KLEI, I. J. Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1803, p.520–525, 2010.

JEFFERY, C. J. Moonlighting proteins-an update. **Molecular BioSystems**, v.5, p. 345-350, 2009.

KANG, S. H.; KRAMER, J. M. Nidogen is nonessential and not required for normal type IV collagen localization in *Caenorhabditis elegans*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 3911-3923, 2000.

KIM, S. H.; TURNBULL, J.; GUIMOND, S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **Journal of Endocrinology**, v. 209, p. 139-151, 2011.

KUNERT, A.; LOSSE, J.; CRUSXIN, C.; HÜHN, M.; KAENDLER, K.; MIKKAT, S.; VOLKE, D.; HOFFMANN, R.; JOKIRANTA, T. S.; SEEBERGER, H.; MOELLMANN,

U.; HELLWAGE, J.; ZIPFEL, P. F. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: Elongation Factor Tuf is a factor h and plasminogen binding protein. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 2979-2988, 2007.

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

KOHAN, M.; MURO, A. F.; WHITE, E. S.; BERKMAN, N. EDA-containing cellular fibronectin induces fibroblast differentiation through binding to $\alpha 4 \beta 7$ integrin receptor and MAPK/Erk 1/2-dependent signaling. **The FASEB Journal**, v. 24, p. 4503-4512, 2010.

LEMAŃSKA-PEREK, A.; PUPEK, M.; POLAŃSKA, B.; LESZEK, J.; KAŃNIK-PRASTOWSKA, I. Alterations in molecular status of plasma fibronectin associated with aging of normal human individuals. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 787-794, 2013.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LEVETT, P. N. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 435-448, 2004.

LEVETT, P. N.; MOREY, R. E.; GALLOWAY, R.; STEIGERWALT, A. G.; ELLIS, W. A. Reclassification of *Leptospira parva* Hovind-Hougen et al. 1982 as *Turneriella parva* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1497-1499, 2005.

LIN, Y. P.; CHANG, Y. F. The C-terminal variable domain of LigB from *Leptospira* mediates binding to fibronectin. **Journal of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 133-144, 2008.

LOCKHART, M.; WIRRIG, E.; PHELPS, A.; WESSELS, A. Extracellular matrix and heart development. **Birth Defects Research (Part A): Clinical and Molecular Teratology**, v. 91, p. 535-550, 2011.

MACEWAN, S. R.; CHILKOTI, A. Elastin-like polypeptides: biomedical applications of tunable biopolymers. **Peptide Science**, v. 94, n. 1, p. 60-77, 2009.

MARQUES, M. A.; CHITALE, S.; BRENNAN, P. J.; PESSOLANI, M. C. Mapping and identification of the major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. **Infect and Immunity**, v. 66, p. 2625-2631, 1998.

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

MAYER, F. Cytoskeletons in prokaryotes. **Cell Biology International**, v. 27, p. 429-438, 2003.

MERI, T.; MURGIA, R.; STEFANEL, P.; MERI, S.; CINCO, M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. **Microbiology Pathogens**, v. 39, p. 139-147, 2005.

MOORE, R. C.; DURSO, N. A.; CYR, R. J. Elongation factor-1 α stabilizes microtubules in a calcium/calmodulin-dependent manner. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 41, p.168-180, 1998.

NILSSON, J.; NISSEN, P. Elongation factors on the ribosome. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 15, p. 349-354, 2005.

OZBEK, S.; BALASUBRAMANIAN, P. G.; CHIQUET-EHRISMANN, R.; TUCKER, R. P.; ADAMS, J. C. The Evolution of extracellular matrix. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, p. 4300–4305, 2010.

PALANIAPPAN, R. U. M.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 20, p.284-292, 2007.

PANGBURN, M. K.; SCHREIBER, R. D.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. **Journal Experimental of Medicine**, v.146, p. 257-270, 1977.

PARMEGGIANI, A.; NISSEN, P. Elongation factor Tu-targeted antibiotics: four different structures, two mechanisms of action. **FEBS Letters**, v. 580, p. 4576-4581, 2006.

PARMEGGIANI, A.; SWART, G. W. M. Mechanism of action of kirromycin-like antibiotics. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, p. 557-577, 1985.

PORCELLA, S. F.; BELLAND, R. J.; JUDD, R. C. Identification of an EF-Tu protein that is periplasm-associated and processed in *Neisseria gonorrhoeae*. **Microbiology**, v. 142, p. 2481-2489, 1996.

RAMOS, C. R. ; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Journal Of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 8, 2004.

RAYNAL, B.; CARDINALI, B.; GRIMBERGEN, J.; PROFUMO, A.; LORD, S. T.; ENGLAND, P.; ROCCO, M. Hydrodynamic characterization of recombinant human fibrinogen species. **Thrombosis Research**, v. 13, p. 1-6, 2013.

RICHARME, G. Protein-disulfide isomerase activity of elongation factor EF-Tu. *Biochem.Biophys.* **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 252, p. 156-161, 1998.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; KERNEIS, S.; SCHMITT, C.; PREVOST, M. C.; LILENBAUM, W.; PICARDEAU, M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, p.1309-1317, 2008.

RODRÍGUEZ-CABELLO, J. C.; MARTÍN, L.; GIROTTI, A.; GARCÍA-ARÉVALO, C.; ARIAS, F. J.; ALONSO, M. Emerging applications of multifunctional elastin-like recombinamers. **Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 111-122, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHAUMBURG, J.; DIEKMANN, O.; HAGENDORFF, P.; BERGMANN, S.; ROHDE, M.; HAMMERSCHMIDT, S. JÄNSCH, L.; WEHLAND, J.; KÄRST, U. The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. **Proteomics**, v. 4, p. 2991-3006, 2004.

SERGIEV, P. V.; BOGDANOV, A. A.; DONTSOVA, O. A. How can elongation factors EF-G and EF-Tu discriminate the functional state of the ribosome using the same binding site? **FEBS Letters**, v. 579, p. 5439-5442, 2005.

SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J. A.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G. R.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6277-6286, 2007.

SINGH, P.; CARRAHER, C.; SCHWARZBAUER, J. E. Assembly of fibronectin extracellular matrix. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, p. 397-419, 2010.

SMITHE, L.; ADLER, B.; HARTSKEERL, R. A.; GALLOW, R. L.; TURENNE, C. Y.; LEVETT, P. N. Classification of leptospira genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthiellii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 1859-1862, 2013.

STEVENSON, B.; CHOY, H. A.; PINNE, M.; ROTONDI, M. L.; MILLER, M. C.; DEMOLL, E.; KRAICZY, P.; COOLEY, A. E.; CREAMER, T. P.; SUCHARD, M. A.; BRISSETTE, C. A.; VERMA, A.; HAAKE, D. A. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. **PLoS ONE**, v. 2, p.1188, 2007.

THOMAS, D. D.; HIGBIE, L. M. *In vitro* association of leptospires with host cells. **Infect and Immunity**, n. 58, p. 581-585, 1990.

TSUCHIMOTO, M.; NIIKURA, M.; ONO, E.; KIDA, H.; YANAGAWA, R. Leptospiral attachment to cultured cells. **Zentralblatt Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene**, v.258, p.268-274, 1984.

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

VIEIRA, M. L.; ATZINGEN, M. V.; OLIVEIRA, MENDES, R .S.; DOMINGOS, R. F.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. Plasminogen binding proteins and plasmin generation on the surface of *Leptospira* spp.: the contribution to the bacteria-host interactions. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-17, 2012.

VIEIRA, M. L.; PIMENTA, D. C.; MORAIS, Z. M. de; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. Proteome Analysis of *Leptospira interrogans* Virulent Strain. **Open Microbiology Journal**, v. 3, p. 69-74, 2009.

VIEIRA, M. L.; ATZINGEN, M. V.; OLIVEIRA, T. R.; OLIVEIRA, R.; ANDRADE, D. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *leptospira interrogans*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. 11259-11259, 2010.

VIEIRA, M. L.; MORAIS, Z. M. de; VASCONCELLOS, S. A. ; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. **Microbiology Pathogens**, v. 51, p. 360-365, 2011.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 4, p. 557–569, 2008.

VINH, T.; FAINE, S.; ADLER, B. Adhesion of leptospire to mouse fibroblasts (L929) and its enhancement by specific antibody. **Journal of Medical Microbiology**, v. 18, p. 73-85, 1984.

WHALEY, K.; RUDDY, S. Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. **Journal Experimental of Medicine**, v. 144, p. 1147-63, 1976.

WEBER, S.; LOTTSPREICH, F.; KÖHL, J. An epitope of Elongation Factor Tu is widely distributed within the bacterial and archaeal domains. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 1, p. 11-19, 1995.

WEIJLAND, A.; HARMARK, K.; COOL, R. H.; ANBORGH, P. H.; PARMEGGIANI, A. Elongation Factor Tu: a molecular switch in protein biosynthesis. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 683-688, 1992.

WONG, D. K.; LEE, B. Y.; HORWITZ, M. A.; GIBSON, B. W. Identification of fur, aconitase, and other proteins expressed by *Mycobacterium tuberculosis* under conditions of low and high concentrations of iron by combined twodimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Infect and Immunity**, v. 67, p.327-336, 1999.

XOLALPA, W.; VALLECILLO, A. J.; LARA, M.; MENDOZA-HERNANDEZ, G.; COMINI, M.; SPALLEK, R.; SINGH, M.; ESPITIA, C. Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the humanpathogen *Mycobacterium tuberculosis*. **Proteomics**, v. 7, p. 3332-3341, 2007.

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

YOUNG, C. C.; BERNLOHR, R. W. Elongation factor Tu is methylated in response to nutrient deprivation in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 3096-3100, 1991.