PRISCILLA YURI OKOCHI ALVES DA SILVA

IMPORTÂNCIA DAS VIAS DO SISTEMA COMPLEMENTO NA ELIMINAÇÃO DE DIFERENTES ESTIRPES PATOGÊNICAS E NÃO PATOGÊNICAS DE LEPTOSPIRA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2017

PRISCILLA YURI OKOCHI ALVES DA SILVA

IMPORTÂNCIA DAS VIAS DO SISTEMA COMPLEMENTO NA ELIMINAÇÃO DE DIFERENTES ESTIRPES PATOGÊNICAS E NÃO PATOGÊNICAS DE LEPTOSPIRA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof.ª Drª Lourdes Isaac

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

SÃO PAULO

2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Silva, Priscilla Yuri Okochi Alves da
Importância das Vias do Sistema Complemento na Eliminação de Diferentes Estirpes Patogênicas e Não Patogênicas de Leptospira / Priscilla Yuri Okochi Alves da Silva; orientadora Lourdes Isaac. -- São Paulo, 2017.
86 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Leptospira. 2. Sistema Complemento. 3. Resistência ao Complemento. 4. Susceptibilidade ao Soro. I. Isaac, Lourdes, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Priscilla Yuri Okochi Alves da Silva

Titulo da Dissertação/Tese: Importância das Vias do Sistema Complemento na Eliminação de Diferentes Estirpes Patogênicas e Não Patogênicas de Leptospira

Orientador: Dra. Lourdes Isaac

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição: .....

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 01 de abril de 2016.

PARECER 1278/CEPSH
CAAE nº 44969315.6.0000.5467

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "***Importância das vias do Sistema Complemento na Eliminação de Diferentes Estirpes Patogênicas e não Patogênicas de Leptospira***" da pesquisadora Profa. Dra. **Lourdes Isaac**.

Cabe à pesquisadora elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **01.04.2017**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAOLO MARINHO ANDRADE ZANOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico meu trabalho aos amores da minha vida.

Aos meus pais Wilson e Emilia e ao meu querido irmão Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais Wilson e Emilia por sempre me apoiarem, em tudo que faço.Obrigada por sempre estarem ao meu lado, pela dedicação, respeito, atenção, afeto e amor. Agradeço também ao meu irmão Rodrigo, por me trazer alegria desde que nasceu.Sua presença em minha vida é a minha maior alegria, obrigada pelo companheirismo, amor, carinho, respeito e pela pessoa maravilhosa que é. Sempre estão ao meu lado, são essenciais para minha vida. Amo vocês!

À minha orientadora Lourdes, por me receber e confiar como aluna, por ter muita paciência comigo sempre, pelos conselhos, ensinamentos que levarei para minha vida toda, pois o conhecimento que ganhei nesses anos ao teu lado, não tem preço.

Ao Leonardo por ter me acompanhado desde que entrou no laboratório, ajudou inúmeras vezes em meus experimentos, muitas conversas boas e engraçadas, obrigada por ser sempre companheiro e me ajudar a passar as horas divertidamente, enquanto fazíamos o nosso trabalho, adorei trabalhar com você.

À Denise, minha querida amiga, a 7 anos juntas e que venham mais anos de amizade. Agradeço pela sua companhia no laboratório, fora do expediente, nos restaurantes, barzinhos, a caminho de casa; pela ajuda, pelo apoio moral, conselhos e risadas. Aishiteru!

À Anielle, Júlia, Thaís, Catarina, Elena e Claudinha pelo companheirismo, risadas, apoios nos momentos que sempre precisamos, pela ajuda oferecida de todas vocês, sempre estarão em meu coração, adoro todas vocês.

À Marlene por me ensinar muita coisa, por me receber com muito carinho e paciência quando entrei no laboratório. Obrigada pela amizade, conselhos e seu apoio.

Aos ex-alunos Íris, Leandro, Adriana, Mónica e Tatiana pelos ensinamentos e companhia.

À Rosana Duarte Prisco pelas análises estatísticas e pelos dias com trabalho e conversas agradáveis.

Ao Dr. Marcos Bryan, Gisele e Antônio da Faculdade de Medicina Veterinária-USP por fornecer as leptospiras utilizadas neste trabalho.

Aos meus queridos “irmãos” Carla e David, por sempre estarem ao meu lado, me fazendo companhia, incentivando e apoiando em todas as escolhas da minha vida, vocês são meus amigos de dentro e fora da USP, são as amizades que levamos para a vida. Obrigada por serem esses amigos maravilhosos e pelo imenso carinho. Amo vocês!

Aos meus amigos do laboratório LIH: Tábata, Paola, Chris Lambert, Chris, Marina, Zé, Lucila, Núria, Renata, Leandro e Silvana. Obrigada pela ajuda de vocês, disposição, risadas e companheirismo.

Aos meus amigos do departamento: Fernanda, Caio, Josi, Beth, Dhemerson, Vinícius, Jô, Eliseu, pelas ajudas, conversas divertidas e o carinho.

A todos os professores, funcionários e alunos do Departamento de Imunologia, tenho muita gratidão a todos pela atenção e auxílio.

Aos meus amigos da vida: Diego, Bruna, Akira, Darly, Deborah, João, Samira, Mariana, Ana, Karem, Sheyla, Edivilson, Jurandir, Marlene Denise de Assis, muito obrigada por todo apoio dado por vocês sempre. O carinho e a torcida de vocês foram muito importantes nesse processo da minha vida.

A todos os amigos que tenho no meu convívio, que fazem parte da minha infância, obrigada pela torcida de todos vocês.

AGRADECIMENTOSÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

À Capes - PROEX pelo auxílio financeiro pessoal durante todo o período do mestrado.

À Fapesp pelo auxílio financeiro do laboratório. Processos: 2010/50043-0 e 2015/09972-0.

“A lei da mente é implacável.
O que você pensa, você cria;
O que você sente, você atrai;
O que você acredita, torna-se realidade. ”

Buda

RESUMO

Silva PYOA da. Importância das Vias do Sistema Complemento na Eliminação de Diferentes Estirpes Patogênicas e Não Patogênicas de *Leptospira*. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

A *Leptospira* é o agente etiológico da leptospirose, uma das mais importantes zoonoses, considerada um grande problema de saúde pública mundial. São observados aproximadamente um milhão de casos mundialmente a cada ano, principalmente em países em desenvolvimento com clima ameno ou tropical, sendo 5% a 10% fatais. As leptospiras são bactérias espiroquetas de vida extracelular, com capacidade de multiplicar-se e disseminar-se em vários tecidos. A presença desse microrganismo no hospedeiro ativa os mecanismos de defesa tanto da resposta imune inata quanto da resposta adaptativa, entre eles: a ativação do Sistema Complemento, a fagocitose e a produção de anticorpos específicos. Dados da literatura demonstraram que algumas espécies patogênicas são resistentes à ação do Sistema Complemento, enquanto que as espécies não patogênicas são sensíveis, uma vez que são rapidamente eliminadas na presença de soro humano normal (SHN). Neste estudo, expandimos o número de espécies de leptospiras estudadas, sendo: sete estirpes patogênicas e duas não patogênicas, com a finalidade de aprofundar o nosso conhecimento sobre a susceptibilidade e resistência dos diferentes sorovares à ativação de Sistema Complemento. Nos ensaios de sobrevivência, os sorovares das espécies patogênicas mostraram-se resistentes em todas as condições avaliadas.Os dois sorovares daespécie não patogênica (*L. biflexa* sorovar Andamana e sorovar Patoc) mostraram-se susceptíveis à ação do Sistema Complemento em presença do SHN, como esperado.Quando incubadas com SHN+EDTA 10 mM porcentagem de sobrevida foi semelhanteao SHNi e ao SHN+EGTA 10 mM em menor medida.Ensaios de sobrevivência com soros depletados de C1q, de FD, e soro deficiente de MBLsugerem que a Via Clássica, com menor contribuição e, principalmente, a Via das Lectinas foram importantes para eliminar os sorovares não patogênicos. A interação das proteínas C3, C5, C6, C7, C8 e C9 com a superfície das espécies patogênicas e não patogênicas foi avaliada por *Western Blot* e ELISA. Diante dos resultados obtidos, não observamos diferenças significativas na deposição de C3 entre as espécies aqui estudadas.Foi observado maior deposição das proteínas C5, C8 e C9 na bactéria não patogênica sorovar Andamana quando comparada a alguns sorovares patogênicos.Em relação às proteínas C6 e C7, houve uma maior deposição em ambas as estirpes sensíveis ao soro, sorovar Andamana e sorovar Patoc, quando comparadas com as sete estirpes patogênicas estudadas. Os sorovares não patogênicos, apesar de pertencer à mesma espécie (*L. biflexa*), tiveram uma interação diferenciada com os componentes do Complemento, observando uma maior deposição no sorovar Andamana, em relação ao sorovar Patoc. Nosso trabalho sugere que a Via das Lectinas é a melhor via de ativação para eliminar as leptospiras não patogênicas, a Via Clássica contribui minimamente, e por fim, a Via Alternativa não possui relevância na morte das mesmas. As leptospiras patogênicas não são afetadas pelo Sistema Complemento.

Palavras-chaves: *Leptospira*. Sistema Complemento. Resistência ao Complemento. Susceptibilidade

ABSTRACT

Silva PYOA da. Importance of Complement System Pathways in the Elimination of Different Pathogenic and Non-Pathogenic Strains of *Leptospira.*[Masters thesis (Immunology)].São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Leptospira is the etiological agent of leptospirosis, one of the most important zoonoses and a major public health problem worldwide. There are one million cases worldwide observed each year, especially in developing countries with mild or tropical climate, being 5% to 10% fatal. Leptospires are spirochetes of extracellular life, with the ability to multiply and spread in various tissues. The presence of this microorganism can activate host defense mechanisms of both the innate immune response and the adaptive response, among them: activation of the Complement System, phagocytosis and production of specific antibodies. Literature data show that there are pathogenic species that are resistant to the action of the Complement System, whereas species that are non - pathogenic are sensitive, since they are rapidly eliminated in the presence of normal human serum (NHS). In this study, we expanded the number of leptospira species studied: seven pathogenic strains and two non-pathogenic strains, in order to deepen our knowledge about the susceptibility and resistance of different serovars to Complement System activation. The serovars of the pathogenic species proved to be resistant in all conditions evaluated. The two non-pathogenic serovars (*L. biflexa* serovar Andamana and serovar Patoc) were susceptible to the action of the Complement System in the presence of NHS as expected. When incubated with 10 mM NHS+EDTA, the survival percentage was similar to the incubation with iNHS and, to a lesser extent, to 10 mM NHS+EGTA. Survival tests with serum depleted from C1q, FD and MBL deficient serum suggest that the Classical Pathway, with a lower contribution, and the Lectin Pathway were important to eliminate the nonpathogenic serovars. Western Blot and ELISA evaluated interactions between the C3, C5, C6, C7, C8 and C9 proteins and the surface of the pathogenic and non-pathogenic species. In view of the results obtained, we didn't observed anything significant in the deposition of C3 among the species studied here. A higher deposition of C5, C8 and C9 proteins was observed in the nonpathogenic bacterium Andamana when compared to some pathogenic serovars. Regarding the C6 and C7 proteins, a greater deposition in both serum-sensitive strains, serovar Andamana and serovar Patoc, when compared to the seven pathogenic strains studied. Non-pathogenic serovars, although belonging to the same species (*L. biflexa*), had different interactions with the components of the Complement, observing a greater deposition in the Andamana serovar, in relation to the serovar Patoc. Our work suggests that the Lectin Pathway is the best route of activation to eliminate nonpathogenic leptospires. Classical Pathway contributes minimally and, finally, the Alternative Pathway has no relevance in the death of these pathogens. Pathogenic leptospires are not affected by the Complement System.

Key words: Leptospira.Complement System.Complement Resistance.Susceptibility

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de transmissão da leptospirose. 19

Figura 2 -*L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagie. 20

Figura 3 - Classificação de espécies de *Leptospira*.. 21

Figura 4 – Ativação da Vias do Sistema Complemento.. 28

Figura 5 - Modelo parcial do MAC. 32

Figura 6 -Sobrevida de leptospira não patogênicas na presença de soros tratados com EDTA e EGTA. 46

Figura 7 - Sobrevida de leptospira patogênica na presença de soros tratados com EDTA e EGTA. 47

Figura 8 - Resistência ao soro de estirpes não patogênicas de *Leptospira* 48

Figura 9 - Resistência de leptospiras patogênicas incubadas com soro. 49

Figura 10 - Sobrevivência de leptospiras não patogênicas na presença de soros depletados. 51

Figura 11 - Interação de leptospiras não patogênicas e patogênicas com C3 53

Figura 12 - Interação de leptospiras não patogênicas e patogênicas com C5 54

Figura 13 - Interação de leptospiras não patogênicas e patogênicas com C6 55

Figura 14 - Interação de leptospiras não patogênicas e patogênicas com C7 56

Figura 15 - Interação de leptospiras não patogênicas e patogênicas com C8 57

Figura 16 - Interação de leptospiras não patogênicas e patogênicas com C9 58

Figura 17 - Níveis de deposição de C3 em nove estirpes de *Leptospira* analisada por ELISA. 59

Figura 18 - Níveis de deposição de C5e C6 em nove estirpes de *Leptospira* analisada por ELISA. 60

Figura 19 - Níveis de deposição de C7e C8 em nove estirpes de *Leptospira* analisada por ELISA. 61

Figura 20 - Níveis de deposição de C9e MAC em nove estirpes de *Leptospira* analisada por ELISA. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies e diferentes estirpes de Leptospira utilizadas.....40

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

ANOVA – Ánalise de variância
BCR – do inglês, *B cell receptor*
BSA – Albumina de soro bovino
C1-INH - do inglês, *C1 Inhibitor*
C4BP - do inglês, *C4b-Binding protein*
Ca^{2+} - Cálcio
CR 2/3/4 – Receptor de Complemento 2/3/4
DNA – Ácido desoxirribonucléico
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA - Ácido etileno glicol tetra-acético
ELISA – do inglês *Enzyme Lynked Immuno Sorbent Assay*
EMJH - do inglês *Ellinghausen McCullough* modificado por *Johnson e Harris*
FB – Fator B
FD – Fator D
FH – Fator H
FI – Fator I
IFN-γ – Interferon gama
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL-10 – Interleucina 10
IL-1β - Interleucina1β
IL-6 – Interleucina 6
Kb - Kilobase
kDa – Kilodalton
LcpA - do inglês, *Leptospiral complement regulator acquiring protein A*
LenA/B - do inglês, *Leptospiral endostatin-like protein A/B*
LipL32 – do inglês, *Leptospiral lipoprotein* 32
LPS – Lipopolissacarídeo
Lsa23/26/36 – do inglês *Leptospiralsurface adhesin* 23/26/36
MAC – Complexo de Ataque a Membrana
MAC/PF – Domínio Complexo de Ataque a Membrana/Perforina
MASP 1/2/3 - do inglês, *Mannos- associated serine protease*
MAT – do inglês *Microscopic Agglutinaion Test*
MBL – do inglês, *Mannose binding-lectine*
Mg^{2+} - Magnésio
NLR1 – Receptor do tipo NOD 1
PBS – do inglês, *Phosphate buffered saline*
PCR – Reação de cadeia da polimerase
PRR - do inglês, *Pathogen recognition receptors*
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida
SHN – Soro humano normal
SHNi – Soro humano normal inativado
TED – Domínio tiol-éster
TLR 2/4 – Receptor do tipo Toll 2/4
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
Tris – Trizma base

SUMÁRIO

1 Introdução 17
1.1 Leptospirose 17
1.2Leptospira 18
1.3 Manifestações clínicas 20
1.4 Diagnóstico laboratorial 22
1.5 Tratamento 23
1.6 Respostas imunes contra espécies de leptospira 23
1.7 Sistema Complemento 25
1.7.1 Via Clássica 27
1.7.2 Via das Lectinas 29
1.7.3 Via Alternativa 30
1.7.4 Via Terminal Comum 31
1.8 Proteínas do Sistema Complemento 32
1.8.1 C3 32
1.8.2 C5 33
1.8.3 C6 33
1.8.4 C7 34
1.8.5 C8 34
1.8.6 C9 35
1.9 Mecanismos de evasão da leptospira pelo Sistema Complemento 35
2 Objetivos 38
2.1 Objetivo Geral 38
2.2 Objetivos específicos 38
3 Delineamento experimental 39
4 Material e métodos 40
4.1 Sorovares de leptospiras e condições de cultivo 40
4.2 Soro humano normal, inativado e depletado 40
4.3 Avaliação do papel das três vias do Complemento na sobrevida de leptospiras 41
4.4 Anticorpos 41
4.5 Interação das leptospiras com as proteínas do Complemento 42
4.6 *Western Blot* 42

4.7 ELISA 43
4.8 Análise Estatística 44
5 Resultados 45
5.1 Avaliação da interferência de EDTA e EGTA na susceptibilidade de leptospiras aos soros tratados com tais quelantes 45
5.2 Avaliação de susceptibilidade a soros depletados com as estirpes não patogênicas 49
5.3 Avaliação da deposição das proteínas do Complemento na superfície das leptospiras 50
6 Discussão 63
7 Conclusões 70
Referências* 71

1 Introdução

1.1Leptospirose

A *Leptospira* é o agente etiológico causador da leptospirose, uma das mais importantes zoonoses, considerada um importante problema de saúde pública mundial (Adler, Moctezuma, 2010). Mais de um milhão de casos desta doença são reportados a cada ano, sendo que a mortalidade excede 10% quando a doença chega à fase crônica (Costa et al., 2015).

Os maiores índices desta enfermidade são observados em países tropical e sub-tropical de climas temperado, ameno ou úmido localizados na América Central e do Sul, Ásia e Oceania. A deficiência no saneamento básico e a combinação com condições precárias de moradia aumentam o risco para surtos de leptospirose em comunidades como favelas urbanas ou rurais (Bharti et al, 2003; Reis et al, 2008). Esses fatores são acompanhados pela exposição à urina de roedores contaminados, especialmente em regiões que costumam ser inundadas (Reis et al, 2008).

Há casos relatados de surtos acidentais também em países desenvolvidos como Canadá, Estados Unidos e Europa, onde grande número de atividades esportivas aquáticas como exploração de cavernas, canoagem c*rafting*podem ser praticados em locais com águas contaminadas por leptospiras patogênicas ou em países que sofreram inesperadas enchentes (Waitkins, 1986; Sejvar et al., 1987; Wilkins, Cope, 1988;Morgan et al., 2002; Sejvar et al., 2003;Evangelista, Coburn, 2010; Fraga et al., 2014),ou em eventos competitivos como Olimpíadas, em competições de natação, pólo aquático e canoagem como citado acima que podem potencializaresses surtos (Morgan et al., 2002; Sejvar et al., 2003) em áreas contaminadas .

A mais importante fonte de transmissão da doença em regiões urbanas é pela urina contaminada de roedores **(Figura 1)**. As principais formas de contágio ocorrem pela penetração da bactéria através de escoriações ou cortes na pele ou por mucosas. A exposição pode ocorrer pelo contato direto com um animal infectado e indiretamente por meio da água ou do solo contaminados. O contágio ocupacional também é frequentemente relatado como, por exemplo, entre trabalhadores expostos ao esgoto, de abatedouros, fazendeiros, veterinários, piscicultores ou militares em exercícios em áreas contaminadas (Adler, Moctezuma, 2010; Fraga et al., 2011, 2014; Wasinski, Dutkiewicz, 2013). Os agricultores produtores de arroz, banana, cana de açúcar e abacaxi, sofrem riscos para leptospirose, pois

essas ocupações são susceptíveis a cortes e abrasões, que estarão em contato com solos ouágua contaminados com urina de roedores e outros animais atraídos pela fonte de alimento (Smythe et al., 1997; Levett, 2001). Para prevenir estas infecções, é necessário o uso de equipamentos de proteção pessoal adequados como botas de borracha, luvas e protetor ocular. A avaliação de risco local e treinamento dos trabalhadores são essenciais para a prevenção da doença em atividades ocupacionais (Steneroden et al., 2011).

1.2Leptospira

A leptospira é uma espiroqueta **(Figura 2)**, pertence ao gênero *Leptospira*, família *Leptospiraceae*, da ordem *Spirochaetales.* Com 0,1 µm de diâmetro e 6-20 µm de comprimento, com estrutura helicoidal, são descritas 22 espécies de *Leptospira* e inclui sete espécies saprófitas (não patogênicas), cinco intermediárias que causam vários sintomas clínicos mais leves de leptospirose e por fim, 10 espécies patogênicas, compondo mais de 200 sorovares diferentes **(Figura 3)** (Faine et al, 1999; Martini, Prado, 2007; Adler, Moctezuma, 2010; Levett, Adler, 2015; revisado por Picardeau, 2017).

A leptospira é formada por uma dupla membrana. Na membrana externa, as moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) são abundamente encontradas. Entre a membrana externa e a membrana interna há uma camada abundante de peptideoglicano. As leptospiras têm grande mobilidade, podendo ser importante para sua virulência. Dois genes *flaA* e *flaB* foram descritos no genoma de *L. interrogans* e estão relacionados com esta propriedade (Picardeau et al., 2001; Ren et al., 2003; Malmstrom et al., 2009; Evangelista, Coburn, 2010, Fraga et al., 2011, 2014).

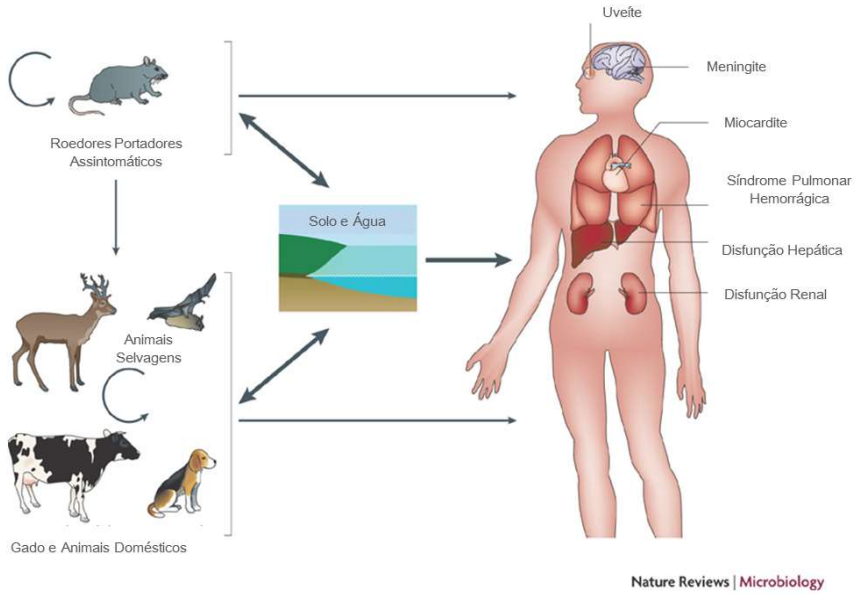


Figura 1 - Ciclo de transmissão da leptospirose. Roedores, animais selvagens e domésticos podem ser reservatórios de leptospiras. Esses animais eliminam esta bactéria pela urina contaminando água e solo. Em roedores, a persistência dessas bactérias é crônica e assintomática. Em animais domésticos e selvagens podem ocorrer manifestações como uveíte e aborto espontâneo. Humanos são hospedeiros acidentais e contraem a doença em contato direto com animais, ou água ou solo contaminados, podendo apresentar vários sintomas. Fonte: Modificado de Ko et al. (2009).

Tanto as leptospiras saprofíticas quanto as patogênicas crescem sob condições aeróbicas. As saprófitas possuem uma ótima taxa de crescimento *in vitro* entre 28 ºC a 30 ºC e podem crescer no ambiente em baixas temperaturas entre 11 ºC a 13 ºC. Leptospiras patogênicas também exibem um crescimento ótimo *in vitro* entre 28 ºC a 30 ºC, porém *in vivo* multiplicam-se à temperatura de 37 ºC e não apresentam crescimento em baixas temperaturas. O pH ótimo varia entre 7,2 a 7,6. O número de leptospiras patogênicas em cultura dobra em aproximadamente 14 a 18 horas; enquanto o númerodas estirpes saprofíticas em aproximadamente 4 a 5 horas (Faine et al., 1999; Cameron, Adler, 2015). Para a cultura de leptospiras, o meio líquido mais utilizado é Ellinghausen McCullough modificado por Johnson e Harris (EMJH) (Johnson, Harris, 1967a), suplementado com soro de coelho ou albumina de soro bovino (Zuerner, 2005).

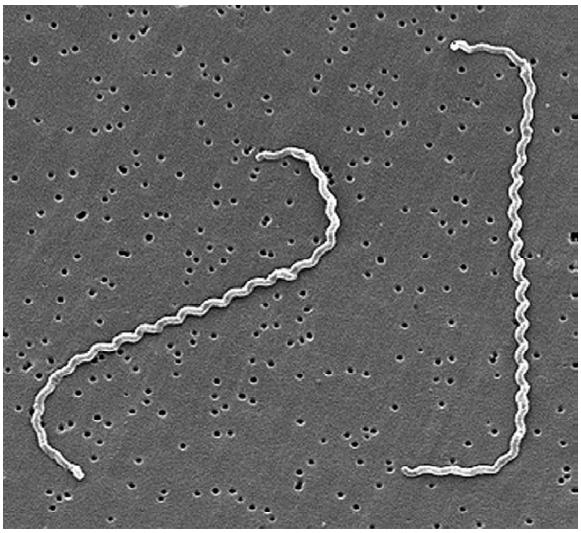


Figura 2 - *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagie. Micrografia eletrônica da estirpe RGA ligada a filtro de membrana de 0,2 µm (Levett, 2001).

1.3 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da leptospirose podem ser divididas em duas fases com amplo conjunto de sintomas: a fase aguda e a fase crônica. As manifestações clínicas aparecem com 4 a 6 dias da doença, em geral, os pacientes manifestam dor de cabeça, febre (em torno de 39 ºC), calafrios, mal-estar, mialgia, náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal, contribuindo assim, com um quadro de desidratação dos pacientes com insuficiência renal causada pela leptospirose. O índice de pacientes com tais manifestações está em torno de 90% dos casos, considerada como a forma branda e aguda da doença (Guerra, 2009 *apud* Heath et al., 1965; Adler, Moctezuma, 2010; Forbes et al., 2012; Fraga et al., 2014; Haake, Levett, 2015). Um sinal para possível diagnóstico de leptospirose é o derrame conjuntival, que ocorre com muita frequência. Os sintomas oftalmológicos podem indicar leptospirose, pois são incomuns em outras doenças infecciosas e podemencontrar evidências de hemorragia subconjuntival e icterícia (Burt et al., 2012).

A segunda fase da doença pode ser mais grave podendo estar acompanhada por nefrite intersticial e hemorragia pulmonar e é caracterizada pela disfunção de múltiplos órgãos incluindo fígado, rins, pulmões e cérebro. A combinação da icterícia e a falência renal pode ser um forte indício da síndrome de Weil, descrita primeiramente em 1886 (Weil, 1886). Esta combinação de sintomas continua a ser uma das formas clínicas mais reconhecidas de leptospirose (Forbes et al., 2012; Adler, 2015). Nesta fase, o paciente pode apresentar

hepatomegalia, esplenomegalia, meningite, icterícia, falência hepática, renal e pulmonar, sendo este último responsável pela maior taxa dos casos de óbito (Adler, Moctezuma, 2010; Haake, Levett, 2015). Em exames bioquímicos do sangue podem ser detectados taxas discretamente elevadas de transaminases hepáticas, bilirrubina direta, uréia e creatinina. Nos exames de urina a piúria, hematúria e altos níveis de proteína são observados e, além destes fatos, leptospiras podem ser detectadas na urina. Infecções intrauterinas e morte do feto podem ocorrer em quadros de leptospirose durante a gestação (Adler, Moctezuma, 2010, Fraga, et al., 2011, Lim, 2011).

As manifestações descritas acima são encontradas também em outras doenças infecciosas como dengue, influenza, hepatite, meningo-encefalite, febre amarela e malária, contribuindo assim para um diagnóstico tardio da doença (Lim, 2011) e falhas no registro de casos de leptospirose. Porém, algumas dessas manifestações dependem da patogenicidade de cada estirpe (Adler, Moctezuma, 2010).

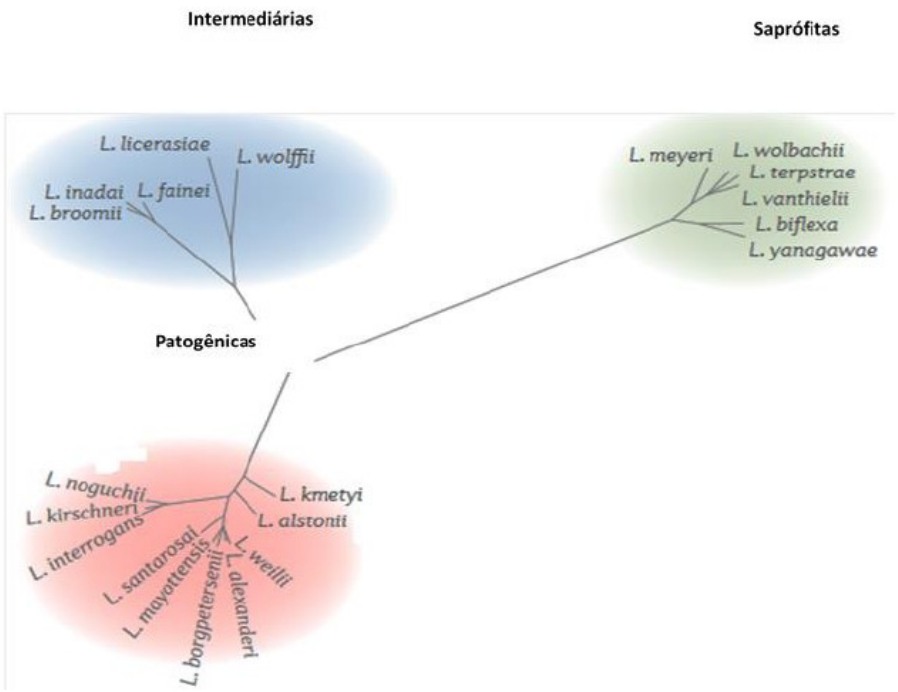


Figura 3 - Classificação de espécies de *Leptospira*. São compostas por dez espécies patogênicas, cinco espécies intermediárias e seis espécies não patogênicas. Fonte: Modificado de Picardeau. (2017).

1.4 Diagnóstico laboratorial

A escolha do diagnóstico laboratorial depende principalmente do estágio da doença e a duração dos sintomas. As análises realizadas incluem microscopia óptica comum sob campo escuro, cultura bacteriana, testes sorológicos como o teste de aglutinação (MAT) e ELISA e a reação em cadeia empregando DNA polimerase (PCR). Destas análises citadas, a cultura bacteriana é a menos eficiente, pela demora de crescimento das leptospiras (Lim, 2011).

Para detecção de DNA de *Leptospira*, são utilizadas amostras de soros, urina, humor aquoso e líquido cerebrospinal para ser amplificado por PCR em tempo real (Levett, 2004). Para o diagnóstico são empregados genes como *rrs*, *gyrB*, *secY, lipL32*, *lig* ou *lfb1,* sendo os três últimos, patógeno-específicos (Ahmed et al., 2012). Este método está sendo empregado com mais frequência nos últimos anos para o diagnóstico precoce, devido a sua sensibilidade (Slack et al., 2007; Ahmed et al., 2009; Thaipadungpanit et al., 2011; Villumsen et al., 2012). O resultado positivo revela a presença de leptospira no organismo, contudo esse teste há uma limitação, pois é ineficaz em identificar o sorovar infectante (Segura et al., 2005; Agampodi et al., 2012; Tubiana et al., 2013).

No MAT o soro dos pacientes infectados reagirá com a suspensão de culturas de diferentes sorovares de leptospiras vivas como antígenos (Picardeau, 2013), a detecção ocorre após a segunda semana da doença. Quando incubados e misturados, a amostra de soro com o antígeno deve ser examinada microscopicamente, empregando microscopia óptica de campo escuro. Sua interpretação é dificultada pela ocorrência de reação cruzada entre os diferentes sorogrupos existentes, principalmente em amostras de soro de pacientes em fase aguda da doença, sendo assim, pouco sensível (Appassakij et al., 1995; Cumberland et al., 1999; Picardeau et al, 2014). Pacientes com carga bacteriana elevada podem falecer antes da soroconversão (Ribeiro et al., 1994). Os dados do MAT apenas fornecem uma informação geral sobre qual o sorogrupo predominante presente dentro de uma população afetada e é um teste empregado mais precisamente, para pesquisas epidemiológicas (Everard, Everard 1993).

A detecção de IgM antileptospiral e específica contra LipL32 por ELISA tem sido empregada amplamente, na maioria das vezes utilizando-se o antígeno preparado a partir de células lisadas de leptospiras patogênicas e não patogênicas (Picardeau, 2013, 2014), em 5 a 7 dias após o início dos sintomas (Lim, 2011). A especificidade deste método é afetada pelo antígeno utilizado no teste, pela presença de anticorpos gerados por exposição anterior (em regiões endêmicas) e pela presença de outras doenças (Bajani et al., 2003; Palaniappan, et al., 2004; Picardeau et al., 2014; Chandy et al., 2017). A pesquisa da presença de IgM específico

por ELISA, no início da fase aguda da doença,está sendo utilizada com mais frequência por ser uma técnicamais sensível que o MAT, porém, após confirmação do resultado sorológico positivo, deve-se usar também o MAT e o PCR (Ribeiro et al., 1994; Winslow et al., 1997; Cumberland et al., 1999; Picardeau et al., 2014), para completar melhor o diagnóstico laboratorial.

1.5 Tratamento

O tratamento de pacientes com leptospirose grave geralmente envolve o uso de antibióticos intravenosos como penicilina, ampicilina, ceftriaxona ou cefotaxima. Em casos de tratamento na fase aguda da doença, são administrados antibióticos via oral como doxiciclina, azitromicina ou amoxicilina (Panaphut et al., 2003; Hospenthal, Murray, 2003; Ressner et al., 2008).

1.6 Respostas imunes contra espécies de leptospira

Com a invasão, a leptospira adere-se aos tecidos do hospedeiro, sendo esse mecanismo o estágio inicial para o sucesso da infecção. Sua multiplicação ocorre no sangue e, uma vez disseminadas no organismo, estas bactérias podem invadir vários tecidos do hospedeiro (Adler, 2015; Evangelista, Coburn, 2010).

Os receptores de reconhecimento de padrões (*PRRs* do inglês – *pathogen recognition receptors*) são um dos principais mecanismos ativados de imediato reconhecendo os antígenos da leptospira, os principais PRRs que irão auxiliar na detecção pertencem a duas famílias destes receptores, os receptores do tipo Toll (*TLRs* do inglês – *Toll-like receptors*) 2 e 4 e os receptores do tipo Nod (*NLRs* do inglês – *Nod-likereceptors*) 1. Todos esses receptores são capazes de reconhecer o LPS bacteriano (Fraga et al., 2011).

O TLR4 é capaz de detectar o lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* em concentrações extremamente baixas, mas o reconhecimento de LPS da leptospira é reconhecida pelo TLR2 em humanos (Werts et al., 2001). No entanto, em camundongos TLR4 é capaz de reconhecer o LPS desta espiroqueta, sugerindo que a resposta imune inata murina é adaptada para este tipo de infecção (Nahori et al., 2005). Essa noção é consistente com diferenças na leptospirose entre humanos e camundongos, sendo o primeiro um potencial hospedeiro acidental e o segundo sendo resistente a esta infecção, servindo como um reservatório natural. A provável susceptibilidade em humanos pode ocorrer devido à incapacidadedo reconhecimento do

lipídio A da leptospira pelo TLR4, ao contrário dos camundongos ou ratos que reconhecem a bactéria por TLR2 e TLR4, esta deficiência de detecção resultará em uma montagem de respostas imunológicas inapropriada para a infecção podendo explicar essa sensibilidade (Chassin et al., 2009).

O reconhecimento de antígenos de leptospira pelos PRRs ativará a resposta imune, com indução de síntese de diversas citocinas, ativação de células imunes tanto da resposta imune inata, quanto da adquirida (Cinco et al., 2002; Evangelista, Coburn, 2010; Fraga et al, 2011).

Células como macrófagos são ativadas por PRRs que reconhecem o LPS do patógeno e quando estimuladas são capazes de produzir diversas citocinas como Interleucina 1β (IL-1β), IL-6, IL-10, Interferon-γ (IFN-γ) e TNF-α (do inglês, *Tumor Necrosis Factor)*. Mesmo estes fagócitos sendo eficientes em muitos casos, as leptospiras de espécies patogênicas são capazes de escapar dos fagossomos destas células ou podem impedir a formação do fagolisossoma, invadindo e se multiplicando no citosol e podem em alguns casos ativar os mecanismos de apoptose do macrófago, liberando mais bactérias na circulação (Isogai et al, 1990; Evangelista, Coburn, 2010). Pesquisas mostram que a morte desta bactéria pela fagocitose pode ser aumentada e eficaz se elas forem previamente opsonizadas com anticorpos, assim irá diminuir a viabilidade celular da leptospira, porém ainda está susceptível a indução de apoptose dependendo da estirpe (Cinco et al., 1981; Merien et al., 2000).

Os linfócitos B são importantes para a produção de anticorpos contra a leptospira, conferem uma ação protetora eficaz, além de auxiliar na ação de outras formas de defesa, como citado no parágrafo acima. Entretanto, mesmo que a leptospira esteja recoberta de anticorpos, não incapacita sua motilidade, é a um dos principais fatores de virulência (Charon et al., 1981). O linfócito T possui um importante papel de produção de IFN-γ, importante citocina que auxilia na ativação dos macrófagos e recrutamento de outros leucócitos para o local da infecção (Chassin et al., 2009)

Além dos fagócitos, um importante protagonista de defesa do nosso organismo é o Sistema Complemento, responsável pela eliminação de bactérias não patogênicas do organismo. No entanto, as espécies patogênicas criaram mecanismos de evasão desta resposta (Barbosa et al., 2009; Cinco, 2010; Fraga et al., 2011), que serão discutidos mais adiante.

1.7 Sistema Complemento

O Sistema Complemento participa tanto da resposta imune inata quanto da adquirida, contra invasão de agentes infecciosos como bactérias, vírus e parasitas (Zipfel, Skerka, 2009; Dunkelberger, Song, 2010). Ele é constituído por mais de 40 proteínas presentes no plasma e/ou expressas em superfícies celulares, com funções reguladoras ou ativadoras, sendo a maioria produzida principalmente pelo fígado (Zipfel, Skerka, 2009; Kolev et al., 2014; Merle et al., 2015a,). O Sistema Complemento pode ser ativado por três vias distintas: Via Clássica, Via Alternativa e Via das Lectinas **(Figura 4)**, que culminam em uma Via Terminal Comum gerando o Complexo de Ataque à Membrana (MAC).

Durante a ativação do Sistema Complemento, muitas proteínas são clivadas e seus produtos podem desempenhar inúmeras funções. Esse fato permite que a imunidade inata realize uma resposta apropriada, pois, além de reconhecer microrganismos invasores, também reconhece células próprias modificadas, geram fragmentos ou proteínas ativadas que facilitam o recrutamento de células e indução de respostas efetoras por opsonização e produção de anafilotoxinas (Zipfel, Skerka, 2009; Dunkelberger, Song, 2010; Zipfel et al., 2013).

Uma das funções importantes que ocorre durante a ativação do Sistema Complemento é a opsonização. Os fragmentos C3b, iC3b e C4b, são opsoninas que, quando ligados a receptores específicos comoo CR3 e o CR4 (do inglês, *Complement Receptor*), facilitam a fagocitose de alvos revestidos por eles e que participam também da remoção de células apoptóticas pela interação com CR3 em monócitos, macrófagos, células dendríticas e células microgliais (Dupuy, Caron, 2008; Baruah et al., 2009; Uotila et al., 2013). A fagocitose mediada por CR3 resulta na apoptose das células fagocíticas, uma importante etapa de resolução de infecção e inflamação (Mayadas, Curelle, 2005).

Os fragmentos C3a e C5a são anafilotoxinas constantemente liberadas durante a ativação do Sistema Complemento e desempenham um papel crítico na modulação da atividade do sistema imune, na inflamação e na ativação de células que expressam receptores C3aR, C5aR1 e C5aR2 (Klos et al., 2009, 2013). Os fragmentos C3a e C5a também recrutam células inflamatórias e induzem estresse oxidativo em macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, potencializando a inflamação (Elsner et al., 1994 a, b; Murakami et al., 1993). Além disso, C3a e C5a causam vasodilatação pela liberação de histamina de grânulos citoplasmáticos de basófilos e mastócitos (Kretzchmar et al., 1993; el-Lati et al., 1994). O fragmento C5a é conhecido por ser uma poderosa molécula quimioatrativa e desempenha um importante papel na resposta inflamatória por recrutar células imunes como macrófagos, neutrófilos, basófilos e

células supressoras mielóide (Lett, Leonard, 1977; Aksamit et al., 1981; Markiewski et al., 2008).

Após ativação do Sistema Complemento, componentes da Via Terminal Comum possuem capacidade lítica direta capaz de matar o patógeno por diferença de osmolaridade (Harboe, Mollnes, 2008). Porém, muitos microrganismos são resistentes à lise pelo Sistema Complemento, tais como as bactérias Gram-positivas, pois possuem uma grossa camada de peptídeoglicano em sua superfície (Joiner et al, 1983; Berends et al, 2013), ao contrário de algumas bactérias Gram-negativas, que são relativamente vulneráveis ao Sistema Complemento (Johnson, Harris, 1967b).

É importante ressaltar a importância do Sistema Complemento na interação da resposta imune inata com a adaptativa, como o fragmento C5a humano, que além de desempenhar um importante papel na inflamação, também recruta células imunes adaptativas, como os linfócitos T, que expressam C5aR1 constitutivamente em sua superfície. Durante a inflamação, as anafilotoxinas C3a e C5a são capazes de se ligar em seus receptores correspondentes expressos nos linfócitos T e superfície das células apresentadoras de antígeno, levando à produção de citocinas por essas células (Strainic et al, 2008).

O fragmento C3a humano é descrito como regulador de linfócitos B, auxiliando na ativação e estimulação destas células e supressão da resposta imune policlonal, liberação de IL-6 e TNF-α de maneira dose dependente, assim, comunicando as imunidades inata com a adaptativa (Fischer, Hugli, 1997; Carroll, 2004). Os fragmentos C3d e iC3b ligados covalentemente na superfície do antígeno, interagem com o receptor do Sistema Complemento CR2 (CD21) expresso em linfócitos B. Assim, o complexo C3d:CR2 induz um aumento na sinalização do receptor de antígenos do linfócito B (BCR, do inglês – *B-cell receptor*) na presença de antígeno opsonizado por C3d na superfície da célula B (Cherukuri et al, 2001). Quando um antígeno opsonizado por C3d liga-se a CR2 em células dendríticas foliculares, eles podem reter o antígeno por mais tempo e induzir células B de memória e células B efetoras (Fang et al, 1998). Esses fatos mostram a importância da expressão de CR2 em superfície das células dendríticas foliculares e linfócitos B para a geração de antígenos específicos (Merle et al, 2015b).

Se estas ações não funcionarem de um modo correto, pode aumentar a susceptibilidade do indivíduo a infecções e doenças, incluindo problemas envolvendo autoimunidade, inflamação crônica, rejeição de enxerto e câncer (Merle et al, 2015b; Meri, Jarva, 1998; Walport, 2001).

1.7.1 Via Clássica

A Via Clássica foi a primeira a ser descrita (Walport, 2001) e é geralmente iniciada com a presença de IgM ou IgG ligadas a antígeno alvo. Entretanto, esta via é capaz de ser iniciada sem a presença destes anticorpos, sendo ativada por certas moléculas com C1q, proteína C-reativa ou pentraxinas que se ligam diretamente em vírus e algumas bactérias Gram-negativas (Gaboriaud et al, 2004; Ricklin et al, 2010; Wallis et al, 2010; Zipfel, Skerka, 2009).

Esta via inicia-se após a ligação de C1q do complexo C1 à porção Fc de anticorpos IgG ou IgM do imunocomplexo. O complexo C1 é formado por uma subunidade de C1q associada a duas moléculas de C1r e duas moléculas de C1s na presença de Ca^{2+}. O anticorpo IgM é um pentâmero que possui um domínio (CH3) de ligação para C1q, expostos após a ligação de IgM ao antígeno. Diferentemente de IgM, o anticorpo IgG apresenta-se como um monômero e, apesar de conter sítios de ligação (CH2) a C1q, expressa menor afinidade pela molécula de C1q do que IgM (Roumenina et al, 2005; Kishore et al, 2004; Merle et al, 2015a; Wallis et al, 2010). Uma vez ligado na superfície alvo, ocorre uma mudança conformacional em C1q, uma vez que acaba por induzir a ativação de C1r. Essa molécula será clivada e posteriormente ativará o C1s. Esta serino protease ativada, subsequentemente cliva-se C4 em C4a e C4b, levando à deposição covalente de C4b sobre as superfícies na vizinhança imediata dos locais de ativação (Bally et al, 2009; Ricklin et al, 2010). A proteína C2 liga-se ao fragmento C4b de maneira dependente de íons de magnésio (Mg^{2+}). Quando C1s é ativado também clivará C2 nos fragmentos C2a e C2b, com o segundo fragmento indo para fase fluida e o fragmento C2a permanece ligado ao fragmento C4b, formando a C3 convertase (C4b2a) (Gregory, et al, 2003; Merle et al, 2015a; Carroll, Isenman, 2012).

Esta convertase é capaz de clivar a proteína C3 em fragmentos C3a e C3b, sendo que C3a auxilia no recrutamento e ativação de células inflamatórias e possui a função de anafilotoxina (Dias da Silva et al, 1967), além de desempenhar um papel relevante na regeneração de órgãos. A deposição de C3b ligado à superfície celular amplifica a cascata de ativação do Sistema Complemento. O fragmento C3b se liga covalentemente em microrganismos ou superfícies apoptóticas, opsonizando-os e facilitando a sua retirada por fagocitose. O fragmento C3b poderá se ligar ao complexo montado C4bC2a, formando a C5 convertase (C4bC2aC3b), dando início à Via Terminal Comum (Zipfel, Skerka, 2009; Meri, Jarva, 1998).

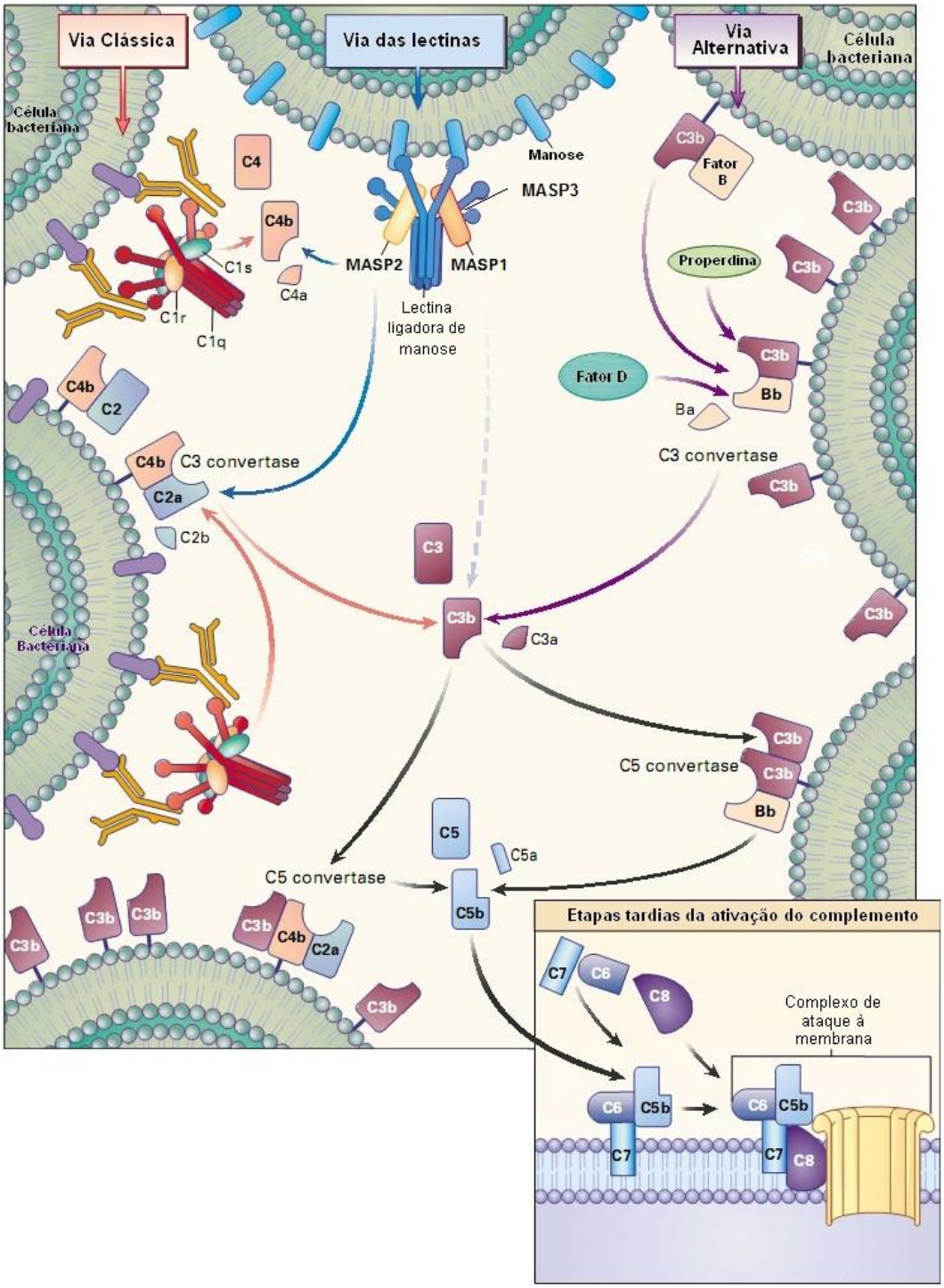


Figura 4 – Ativação da Vias do Sistema Complemento. À esquerda, observamos a Via Clássica que geralmente é ativada após a interação de um anticorpo ligado a um antígeno com o Complexo C1. Ao centro, Via das Lectinas, ativada quando há a interação de lectinas com carboidratos do microrganismo, por exemplo. À direita está ilustrada a Via Alternativa. Essas três vias após serem ativadas clivam a proteína C3 e com outras inúmeras clivagens formam as C5-convertases, assim culminando na Via Terminal Comum. Com ela será formada o Complexo de Ataque a Membrana capaz de lisar vários microrganismos, por exemplo. Fonte: Modificado de Walport (2001).

1.7.2 Via das Lectinas

Esta foi a última via a descrita, na década de 90. Primeiramente acreditava-se que a Via das Lectinas era um mecanismo independente e que a MBL era uma molécula complementar a Via Clássica, participante na ligação e ativação de C1r e C1s (Lu et al, 1990). Iniciada por proteínas que reconhecem carboidratos (lectinas), estruturas altamente conservadas em superfícies microbianas, vírus, protozoários e parasitas multicelulares (Matsushita, Fujita, 1992; Wallis et al, 2010). As moléculas de reconhecimento padrão da Via das Lectinas são: a MBL (do inglês, *mannose binding-lectin*), na qual reconhece monossacarídeos de maneira dependente de Ca^{2+}, ficolinas 1, 2 e 3 (Matsushita et al, 2013; Kjaer et al, 2013) reconhecem açúcares padrões são comumente expressos em bactérias, vírus, fungos e células mortas.

A MBL ou ficolinas quando ligadas à serino proteases associadas à manose 1, 2 e 3 (MASP. Do inglês - *mannose-associated serine protease*) são ativadas após o reconhecimento de açúcares encontrados em microrganismos resultando na clivagem de C4 e C2 pelo MASP-2. Os complexos formados assemelham-se às serino proteases C1r e C1s do complexo C1. O Ca^{2+} medeia às interações tanto entre MBL e MASP, quanto entre ficolinas e MASP (Frederiksen et al., 2005; Krarup et al., 2004; Merle et al., 2015a; Wallis et al., 2010; Zipfel, Skerka, 2009).

Embora o complexo C1 possua uma similaridade estrutural com o MBL/MASPs, o mecanismo inicial de ativação da Via das Lectinas difere da Via Clássica (Kjaer et al., 2013). Enquanto na Via Clássica, cada complexo C1 carrega duas serino proteases, C1r e C1s, a MBL e ficolinas presentes no plasma são associadas apenas a um homodímero de MASP-1 ou MASP-2. Ambas as proteases ativadas podem clivar C2, enquanto MASP-2 pode também clivar C4. MASP-3 não é capaz de clivar C4 e C2 as proteínas (Dobó et al., 2016a; Gál et al., 2005; Yongqing et al., 2012; Merle et al., 2015a), mas é capaz de clivar Fator D (Dobó et al., 2016b). A união de MASP-3 com as demais serino proteases e com molécula de reconhecimento para montagem de sua estrutura, é capaz de inibir a ativação da Via das Lectinas, dissociando MASP-1 e MASP-2 do seu complexo (Matsushita et al., 2000; Dahl et al., 2001; Chen, Wallis, 2006).

Com ação semelhante à C1s ativada, a MASP-2 cliva a proteína C4 em C4a e C4b. A proteína C2 se liga ao fragmento C4b, permitindo que MASP-2 clive C2 em fragmentos C2a e C2b. O fragmento C2a, permanecerá ligado ao C4b, formando a C3-convertase (C4bC2a), clivando C3 em C3a e C3b (Carrol, Isenman, 2012). O fragmento C3b poderá se unir ao

complexo C4bC2b e formará a C5-convertase (C4bC2aC3b), iniciando a Via Terminal Comum (Zipfel, Skerka, 2009; Meri, Jarva, 1998).

As atividades das Vias da Clássica e das Lectinas são reguladas por: inibidor de C1 (C1-INH. Do inglês – *C1 Inhibitor*), a proteína ligadora de C4b (C4BP. Do inglês – *C4b – Binding Protein*) e a proteína de membrana com atividade de cofator (MCP. Do inglês – *Membrane Cofactor Protein*). O primeiro interage tanto com as serino proteases C1r e C1s, promovendo a dissociação de ambas das moléculas de C1q, MASP-1 e MASP-2, inativando-as e inibindo a ativação da Via das Lectinas (Fraczek, Martin, 2010; Vinci et al.., 2002). O segundo regulador, MCP, atua impedindo a montagem da segunda C3-convertase e promove um aceleramento do decaimento deste complexo enzimático e age similarmente a um cofator da clivagem de C4b pelo FI, prevenindo assim a formação das C3- e C5-convertases da Via Clássica e Via das Lectinas (Fujita et al., 1985; Lappin, Whaley, 1990; Meri, Jarva, 1998; Nesargikar et al., 2012; Zipfel, Skerka, 2009). O terceiro atua como outro cofator de FI, mediando à clivagem dos fragmentos C3b e C4b (Nesargikar et al., 2012; Miwa, Song, 2001).

1.7.3 Via Alternativa

A Via Alternativa mantém sempre a vigilância contra invasão de patógenos. É ativada de maneira espontânea e constante em superfícies biológicas, no plasma e em outros fluídos corporais. Essa via inicia-se a partir da hidrólise espontânea da ligação tiól-ester do componente C3, na qual será convertido em C3(H_2O). Após hidrólise, o domínio tiól-ester (TED) de C3 sofre uma mudança estrutural, expondo o sítio de ligação para o Fator B (FB). Por sua vez, o FB ligado a C3(H_2O) é clivado por uma serino protease, o Fator D (FD), formando uma C3 convertase, C3H_2OBb. Nesta etapa, o complexo é capaz de interagir e clivar C3 nativo, gerando novos fragmentos C3a e C3b (Pangburn et al., 1981; Isenman et al., 1981; Winters et al., 2005; Nishida et al., 2006).

A C3-convertase, tanto da Via Clássica quanto da Via das Lectinas, é capaz de amplificar a Via Alternativa. Novos fragmentos de C3b são formados e depositados na superfície celular, até que forme uma nova C3-convertase, criando uma eficiente alça de amplificação que cliva C3 e monta a convertase que amplia a resposta (Ricklin et al., 2010). A properdina é uma proteína reguladora positiva que estabiliza a C3 convertase da Via Alternativa, evitando sua dissociação pelos reguladores negativos desta via, Fator H (FH) e posterior clivagem pelo Fator I (FI), que por consequência a inativariam (Kemper, Hourcade, 2008). Essa proteína pode reconhecer alvos diretamente, sendo assim capaz de ligar-se ao

patógeno, ativando ou danificando células hospedeiras e induzindo a ativação da própria Via Alternativa (Spitzer et al., 2007; Lutz, Jelezarova, 2006).

A deposição de C3b é aumentada pela alça de amplificação, levando à formação da C5-convertase (C4b2a3b ou C3bBb3b). Esta nova convertase cliva a proteína C5 em fragmentos C5a e C5b (Muller-Ebehard, 1985; Ricklin et al., 2010).

Os reguladores negativos FH e FI citados anteriormente são importantes principalmente na formação das convertases da Via Alternatiava. Este fato ocorre devido ao FH possuir múltiplos sítios de ligação para C3b e assim, acelerando o decaimento da C3-convertase da Via Alternativa (Farries et al., 1990). Este serve como cofator por facilitar a clivagem de C3b pelo FI e induz a dissociação do complexo C3bBb, desempenhando um importante papel controlando a Via Alternativa. Por sua vez, o FI cliva a proteína C3, formando novos fragmentos de C3b, tornando-os incapazes de ligar-se ao FB, inibindo a formação das C3 e C5 convertases, na presença dos cofatores moleculares como: Fator H, MCP, CR1 ou C4BP (Merle et al., 2015a; Nesargikar et al., 2012; Minta et al., 1998).

1.7.4 Via Terminal Comum

A ativação da Via Terminal Comum resulta na formação de grandes poros (cerca de 10 nm) na membrana alvo (Bubeck, 2014). Esse novo complexo enzimático cliva C5 em fragmentos bioativos C5a e C5b, sendo a primeira uma poderosa anafilotoxina, induzindo inflamação e também a função de regeneração de órgãos. O fragmento C5b liberado, por sua vez, sofre uma importante mudança conformacional, permitindo a interação de C6 que se envolve no domínio TED de C5b, formando um complexo reversível C5bC6. Após esse evento, a proteína C7 se associará com C5bC6, formando o complexo C5b-7 lipofílico, que se fixa na membrana, acompanhado pela inserção da proteína C8 (C8β - C8αγ). O C9 se ligará ao C8 e iniciará o processo de polimerização de múltiplas proteínas C9, formando o complexo C5b-9, que causará lise celular **(Figura 5)** (Preissner et al., 1985). Um complexo pode conter até 18 moléculas da proteína C9. No entanto, uma ou duas moléculas de C9 já seriam suficientes para formar poros funcionais, favorecendo a entrada de íons e água, aumentando o volume celular e subsequente ruptura celular (Cole, Morgan, 1979; Morgan, 1989; Koski et al., 1983).

Figura 5 - Modelo parcial do MAC. Revelando as proteínas: C6 (azul claro), C7 (rosa), C8β (azul escuro), C8α (vermelho). C8γ (verde) e C9 (amarelo) (Lovelace et al., 2011).

A regulação do MAC é realizada principalmente por CD59, proteína abundante na membrana de vários tipos celulares, tais como leucócitos, células epiteliais e células endoteliais (Bubeck et al., 2011, 2014; Nesargikar et al., 2012; Davies et al., 1989). O CD59 é a principal proteína reguladora da etapa terminal e previne a montagem do MAC por bloqueio da incorporação de C9 ao complexo catalítico de C5b-8, impedindo a formação completa do MAC na bicamada lipídica (Bubeck et al., 2011, 2014; Nesargikar et al., 2012; Meri et al., 1990). O regulador não se liga a componentes C8 e C9 livres, mas interage com domínio MAC/PF de cada proteína sobre uma mudança conformacional associado com complexo de formação C5b-9 (Fletcher et al., 1994).

1.8 Proteínas do Sistema Complemento

1.8.1 C3

A proteína C3 possui 1663 aminoácidos, incluindo um peptídeo líder de 22 aminoácidos. Seu peso molecular é de aproximadamente 187 kDa, composto de duas cadeias, α e β, com pesos moleculares de aproximadamente 110 kDa e 75 kDa, respectivamente. Após clivagem por C3-convertases e outras proteases, observamos seguintes fragmentos: em uma primeira clivagem formará C3a (9 kDa), C3b (177 kDa); na segunda clivagem, C3f (2 kDa); em uma terceira clivagem originará o fragmento iC3b, que irá liberar C3c (135 kDa) e C3dg

(40 kDa) (Janssen et al., 2005; Muller-Eberhard, 1988). Sua concentração no soro é de 1,2mg/ml (Sahu, Lambris, 2001). C3 é produzida principalmente por hepatócitos, monócitos, neutrófilos, células endoteliais capilares e de veia umbilical, epitélio glomerular, mioblastos, astrócitos, células dendríticas entre outras células (Kohler, Muller-Eberhard, 1967; Reis et al., 2006).

O gene *C3* é codificado por 41kb, localizado no cromossomo 19p13.3-p13.2. É composto por 41 éxons, variando seus tamanhos de 52 a 213 bases, sendo que deles, 16 codificam para cadeia β e 25 codificampara cadeia α (de Bruijn, Fey, 1985; Sahu, Lambris, 2001). Sua deficiência pode aumentar a susceptibilidade a infecções piogênicas e ocasionar insuficiência renal como glomerulonefrite membranoproliferativa (Pereira de Carvalho et al., 2003; Reis et al., 2006).

1.8.2 C5

A proteína C5 possui um peso molecular de aproximadamente 185 kDa e possuem dois pontes de dissulfeto nas cadeias, α e β, com pesos moleculares de aproximadamente 115 kDa e 75 kDa, respectivamente. Possui uma sequência de homologia com C3 e C4, incluindo os domínios correspondentes na região tiól-ester (Morley, Walport, 2000). Consiste em 1676 resíduos de aminoácidos, incluindo 18 aminoácidos de peptídeo líder (Ooi, Colten, 1979). É encontrada em concentrações séricas de 75 µg/ml no plasma, sintetizada por hepatócitos, monócitos, macrófagos e células alveolares do tipo II (Kohler, Muller-Eberhard, 1967).

O gene *C5* encontra-se no cromossomo 9q33, com sua estrutura genética de 79 kb. Sua deficiência leva a susceptibilidade a infecções bacterianas, tendo então infecções recorrentes por espécies de *Neisseria* (Haviland et al., 1991; Carney et al., 1991; Wang et al., 1995).

1.8.3 C6

A proteína C6 tem por finalidade ligar os componentes do complexo ao fragmento C5b. Possui um peso molecular de aproximadamente 100 kDa, é sintetizado por um precursor de cadeia única de 913 aminoácidos, incluindo um peptídeo líder de 21 aminoácidos (DiScipio, Hugli, 1989; Aleshin et al., 2012). A molécula pode ser encontrada em concentrações séricas de 45 µg/ml no soro, sendo os hepatócitos e macrófagos as principais células produtoras (Würzner et al., 1991; Hobart et al., 1977).

O gene *C6* está no cromossomo 5p12-14, o gene abrange cerca de 80 kb e é codificado por 18 éxons. Os íntrons variam de 450 pb para 12 kb (Abbott et al., 1988; Hobart et al.,

1993). A deficiência desta proteína leva a um aumento na susceptibilidade a doenças recorrentes de meningite meningocócica e infecções por *Neisseria gonorrhoeae* (Orren et al., 2011).

1.8.4 C7

A proteína lipofílica C7 desempenha um papel essencial na formação do complexo da Via Terminal do Sistema Complemento biologicamente ativa, permitindosua inserção na membrana lipídica do local alvo, servindo como âncora para o restante das proteínas do MAC. Uma glicoproteína sintetizada como um precursor de cadeia única de 843 aminoácidos, incluindo um peptídeo líder de 22 aminoácidos, possui um peso molecular de 95 kDa (DiScipio et al., 1988; Agah et al., 2000). Achado em concentrações séricas de 90 mg/ml, sendo que são sintetizados por granulócitos (Würzner et al., 1991).

O gene *C7* em humanos possui sua localização no cromossomo 5p12-14, semelhante ao gene *C6*, abrangendo também 80 kb e sendo codificado em 18 éxons. Os íntrons são uniformemente espaçados variando de 1 kb para 9 kb (Abbott et al., 1988). A deficiência de C7 leva a uma perda da função lítica do Sistema Complemento, esses pacientes apresentam susceptibilidade a infecções causadas por *N. gonorrhoeae*, apresentando quadros recorrentes de meningite meningocócica (Thomas et al., 2012).

1.8.5 C8

A proteína C8 o primeiro componente que penetra a bicamada lipídica após interação com MAC, medeia a ligação e incorporação de C9 para o MAC. O C8 envolve um sítio de ligação específico de C9 dentro do domínio MACPF C8α (Slade et al., 2006; Lovelance et al., 2011). C8 é uma proteína oligomérica de 150 kDa composta por 3 subunidades não idênticas (α, β e γ), sendo organizados com uma ligação dissulfeto do dímero α-γ e uma cadeia β não-covalentemente associado. É encontrado em concentrações séricas variáveis entre 55 e 80 µg/ml, sintetizados por hepatócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos, astrócitos e células endoteliais (Schreck et al., 2000; Hadders et al., 2007; Slade et al., 2008; Bubeck et al., 2011).

A cadeia C8α possui peso molecular de 64 kDa, possuindo 553 resíduos de aminoácidos, o gene *C8A* está localizado no cromossomo 1p32 e possuem um vão de genes de 70 kb, contendo 11 éxons. A cadeia C8β possui peso molecular de 64 kDa também, possuindo 537 resíduos de aminoácidos, o gene *C8b* está localizado no cromossomo 1p32 e

possuem um vão de genes de 40 kb, contendo 12 éxons. A cadeia C8γ possui peso molecular de 22 kDa, possuindo 182 resíduos de aminoácidos, o gene *C8G* está localizado no cromossomo 9q34.3 e possuem um vão de genes de 1,8 kb, contendo 7 éxons (Morley, Walport, 2000).

1.8.6 C9

A proteína C9 forma um polímero com 12 a 19 cópias da molécula associado ao complexo C5b-8, penetrando na bicamada lipídica e ativando assim sua função lítica formando um poro na membrana da célula alvo. É uma α-globulina de cadeia única de 558 aminoácidos, incluindo um peptídeo líder de 20 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 71 kDa (DiScipio et al., 1984, DiScipio, Hugli, 1985, Tegla et al., 2011). É produzido por hepatócitos, monócitos, fibroblastos, células gliais.

O gene *C9* é localizado no cromossomo 5p13, junto com os genes das proteínas C6 e C7, porém estão minimante por 2,5 kb. Abrange aproximadamente 100 kb e contém 11 éxons. Os tamanhos dos mesmos podem variar entre 100 e 250 pb. Apresenta uma sequência de homologia de 27% com C6 e de 34% de C8α/C8β. A deficiência de C9 possui uma prevalência de 1:1000 em população japonesa, causando um aumento na susceptibilidade para infecção com *Neisseria*, mais comumente manifestado como meningite meningocócica (Hobart et al., 1993; Tegla et al., 2011).

1.9 Mecanismos de evasão da leptospira pelo Sistema Complemento

Diversos microrganismos são capazes de sobreviver, principalmente em hospedeiros imunocompetentes, realizando um eficiente controle e bloqueio da resposta do Complemento e de outras reações imunes (Zipfel et al., 2013). Estes patógenos conseguem evadir do Complemento influenciando sua ativação por diversas maneiras, entre elas: produção de cápsulas que evitam a ativação do complemento; aquisição de algumas proteínas reguladoras de fase fluida do hospedeiro, como FH e C4BP, inibindo assim a Via Clássica, das Lectinas e Alternativa. O FH, quando ligado à membrana externa da bactéria, pode inibir a ativação da Via Alternativa ao se associar ao fragmento C3b, que também se encontra depositado em sua superfície, atuando como um cofator na ação proteolítica do FI, inativando este fragmento. Quando as leptospiras patogênicas interagem com C4BP, retém a atividade de cofator do FI, no qual é o fator importante para a clivagem do fragmento C4b (Meri et al., 2005; Barbosa et

al., 2009; Castiblanco-Valencia et al., 2012); secreção de proteases que clivam e inativam proteínas do Complemento (Fraga et al., 2014; Amamura et al., 2017); e aquisição de proteases do hospedeiro, representando assim uma importante estratégia de evasão imune (Vieira et al., 2009, 2011, 2012; Castiblanco-Valencia et al., 2012; Wolff et al., 2013).

As proteases, secretadas pelas leptospiras patogênicas, são capazes de clivar C3 nativa, C3b e iC3b, bem como o FB, C2 e C4b, assim,inibindo a ativação de todas as vias iniciais do Sistema Complemento (Fraga et al., 2014). Recentemente foram observados que essas proteases também são capazes de clivar as demais proteínas que formam o MAC (Amamura et al., 2017).

As leptospiras patogênicas também possuem a capacidade de adquirir moléculas precursoras proteases do hospedeiro, um exemplo, a mais conhecida é o plasminogênio. Quando ligado à superfície de leptospiras patogênicas, o plasminogênio é convertido em plasmina, capaz de clivar o fragmento C3b e a proteína C5; esta protease também pode degradar fibrinogênio, fibronectina, laminina e elastina (Vieira et al., 2009, 2011, 2012; Castiblanco-Valencia et al., 2012; Wolff et al., 2013).

Sabe-se que as leptospiras possuem proteínas de membrana externa como a *leptospiral complement regulator-acquiring protein A* (LcpA) que se liga a reguladores do Sistema Complemento como C4BP e com FH (Barbosa et al., 2010). Recentemente, Silva et al. (2015) demonstraram a interação da LcpA também à Vitronectina, uma glicoproteína que desempenha um papel principal em processos biológicos de reparação tecidual, migração celular e regulação da via terminal comum por inibição da formação do complexo C5b-7 e polimerização de C9 (Singh et al., 2010, da Silva et al., 2015). Por ensaio de competição, observou-se que esta proteína de membrana interage com as três proteínas reguladoras do hospedeiro por meio de sítios de ligações distintos (da Silva et al., 2015). O fator de elongação Tu e LcpA também se ligam ao FH (Wolff et al., 2013). As leptospiras não patogênicas são susceptíveis à ação do Sistema Complemento e pouco se ligam a esses reguladores negativos (Castiblanco-Valencia et al., 2012).

Outras proteínas como LenA e LenB são conhecidas por se ligarem ao FH, proporcionando às leptospiras uma proteção contra respostas imunes do hospedeiro (Barbosa et al., 2006; Verma et al., 2006; Stevenson et al., 2007). A proteína Lsa23 liga-se aos fatores de regulação FH e C4BP, enquanto as Lsa26 e Lsa36 são capazes de interagir com a laminina

e plasminogênio, tanto quanto com outros componentes da matriz extracelular (Siqueira et al., 2016).

Para avaliar e obter uma maior compreensão de alguns mecanismos de evasão da leptospira, nosso grupo estudou a maneira que algumas espécies (saprófita, patogênica e atenuada) sobrevivem em soro humano normal (SHN) e inativado (SHNi). Como resultado, foi observado maior sobrevida de estirpes patogênicas em SHN e a morte da espécie saprófita. Em outro ensaio estirpes *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I e *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, foram incubadas em SHN, SHNi, soro deficiente de MBL e soro deficiente de C1s e a porcentagem de sobrevivência foi avaliada. Os resultados sugeriram que a Via Alternativa é importante para a eliminação da estirpe Patoc I e a Via Clássica, da estirpe Pomona (Barbosa et al., 2009).

A deposição das proteínas do Sistema Complemento, tais como C3, C4, C5, C6, C7, C8 e C9, foi também quantificada para avaliar a interação destes componentes com a membrana da bactéria em três estirpes diferentes: uma patogênica (*L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm), uma atenuada (*L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona) e uma não-patogênica (*L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I). Com exceção de C4, as demais proteínas do Complemento citadas acima se depositaram na superfície de membrana da estirpe Patoc I mais intensamente em relação às outras estirpes (Barbosa et al, 2009).

Neste trabalho empregamos sete tipos de leptospiras patogênicas e dois de leptospiras não patogênicas, a maioria ainda não estudada, com o objetivo de ter um panorama mais completo sobre a susceptibilidade ou resistência que estas espiroquetas podem apresentar quando o Sistema Complemento é ativado, especialmente nos momentos iniciais da infecção. Nesta investigação aprofundaremos também o estudo da contribuição das diferentes vias de ativação do Complemento envolvidas com o controle desta infecção.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a importância da ativação de cada via do sistema complemento na sobrevida de espécies não patogênicas e patogênicas de *Leptospira*.

2.2 Objetivos específicos

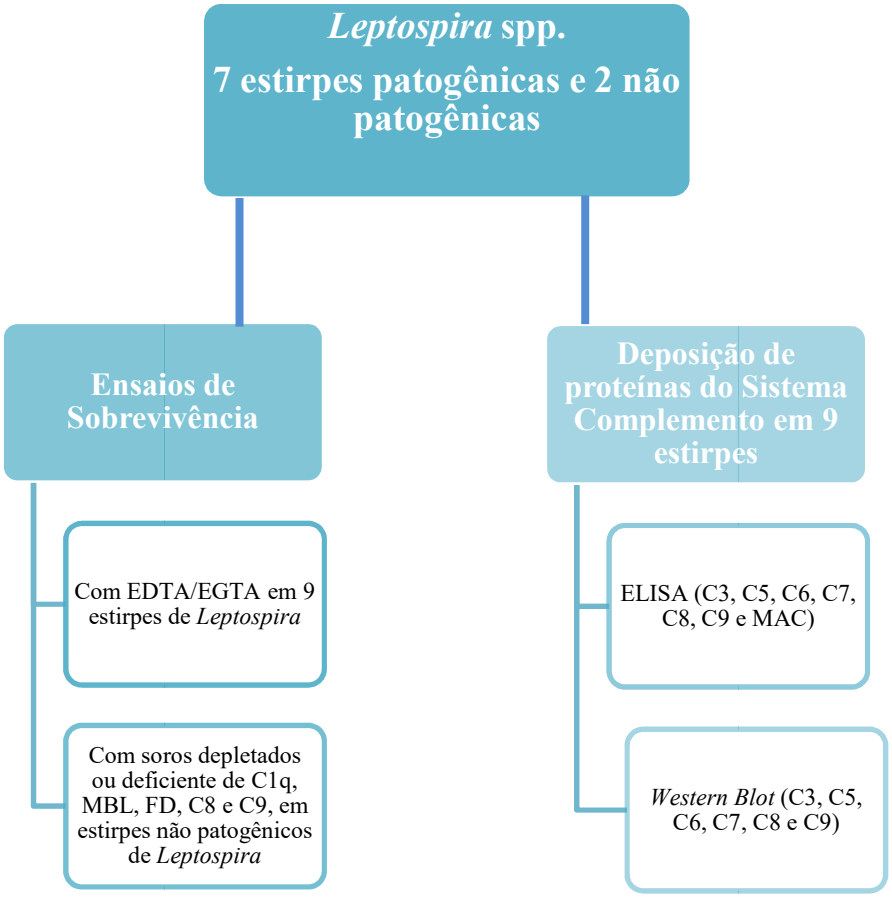
1. Avaliar a sensibilidade de 9 estirpes de*Leptospira* em soros humanos normais, soro normal inativado pelo calor e soros tratados com quelantes (EDTA/EGTA 10 mM), pela contagem de bactérias vivas por microscopia óptica sob campo escuro.

2. Avaliar a sensibilidade das estirpes não patogênicas quando desafiadas a soros depletados ou deficiente das proteínas: C1q, MBL, FD, C3, C5, C6, C7, C8 ou C9, após contagem de bactérias vivas por microscopia óptica sob campo escuro.

3. Avaliar a interação das leptospiras com as proteínas do Complemento, analisando a deposição de C3, C5, C6, C7, C8 e C9 por *Western Blot*.

4. Avaliar a deposição das proteínas C3, C5, C6, C7, C8, C9 por ELISA.

3Delineamento experimental



4 Material e métodos

4.1 Sorovares de leptospiras e condições de cultivo

Utilizamos sete sorovares patogênicos e dois sorovares não-patogênicos de *Leptospira*, conforme a **Tabela 1**. As culturas foram fornecidas pelo Prof. Marcos Bryan Heinemann, do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As leptospiras foram cultivadas por cinco dias, a 29 ºC, sob condições aeróbicas, em meio líquido Ellinghausen McCullough modificado por Johnson e Harris (EMJH - Difco® EUA) suplementado com 10% de albumina de soro bovino (BSA), enriquecido de L-asparagina (0,015%), piruvato de sódio (0,001%), cloreto de magnésio (0,001%), cloreto de cálcio (0,001%), peptona (0,03%).

Leptospiras patogênicas
L. interrogas sorovar Kennewicki estirpe Fromm
L. interrogans sorovar Pomona estirpe Pomona
L. noguchi sorovar Panama estirpe CZ 214
L. kirshneri sorovar Cynopteri estirpe 3522 C
L. interrogans sorovar Pyrogenes estirpe Salinen
L. interrogans sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe RGA
L. interrogans sorovar Copenhageni estirpe 10A

Leptospiras saprófitas
L. biflexa sorovar Patoc estirpe Patoc I
L. biflexa sorovar Andamana estirpe CH11

Tabela 1 - Espécies e diferentes estirpes de *Leptospira* utilizadas.

Para a manutenção da virulência da *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foram necessárias passagens repetidas desta bactéria em hamsters, cujo procedimento foi realizado no laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Já as atenuações das demais estirpes patogênicas foram feitas por passagens sucessivas em meio de cultura EMJH enriquecido com BSA em nosso laboratório.

4.2 Soro humano normal, inativado e depletado

As amostras de soro humano normal (SHN) foram obtidas de doadores adultos sadios, após consentimento informado e assinado, aprovada pela Comissão de Ética CAAE n°

44969315.6.0000.5467, misturadas, aliquotadas e congeladas a -80 ºC até o momento de uso. Como controle negativo, empregamos SHN inativado (SHNi) após aquecimento a 56 ºC por 60 minutos. Em alguns experimentos, utilizamos soros de pacientes deficientes de MBL ou soros comerciais depletados das seguintes proteínas: C1q, FD, C8 e C9 (*Complement Technology*®).

4.3 Avaliação do papel das três vias do Complemento na sobrevida de leptospiras

Amostras de suspensões bacterianas contendo aproximadamente 1 x 10^8 leptospiras/ml, cultivadas em meio EMJH com BSA foram incubadas a 37 ºC por 120 minutos, com 40% de SHN, SHNi, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 5 ou 10 mM, ácido etileno glicol tetra-acético (EGTA+Mg^{2+}) 5 ou 10 mM, SHN tratado com 5 ou 10 mM de EDTA, SHN tratado com 10 mM de EGTA, soro humano deficiente de MBL ou soros humanos depletados comerciais de C1q, FD, C8 e C9, um volume final de 200 µl. Para atingir os volumes finais, foi adicionado meio de cultura de leptospiras (EMJH-BSA). Após incubação, a sobrevivência das estirpes na presença de cada tipo de soro foi estimada com a contagem do número de bactérias viáveis em câmara de Petroff-Hausser empregando microscopia óptica sob campo escuro. A sobrevivência das leptospiras na presença de cada soro foi comparada àquela observada com SHNi (100% de sobrevida). As leptospiras mortas fragmentam-se rapidamente e não são mais visualizadas ao microscópio óptico de campo escuro (Barbosa et al., 2009).

4.4 Anticorpos

Os anticorpos policlonais específicos contra proteínas do Complemento foram obtidos comercialmente da empresa *Complement Technology* (Texas, TX., Estados Unidos). Os anticorpos primários anti -C3, -C5, -C6, -C7, -C8, -C9 humanos feitos em cabra, foram utilizados nas diluições de 1: 2500 ou 1:5000. O anticorpo secundário anti- IgG de cabra conjugado com peroxidase obtido de coelho foi empregado nas diluições de 1:5000 ou 1:10000 da empresa Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc (Gaithersburg, MD, Estados Unidos).

4.5 Interação das leptospiras com as proteínas do Complemento

Este ensaio foi realizado para avaliar a deposição das proteínas do Complemento na superfície da *Leptospira*. As culturas de leptospiras foram centrifugadas a 2800x*g* por 20 minutos a 20 ºC e os precipitados foram lavados duas vezes com PBS 1x (cloreto de potássio 2,7 mM, cloreto de sódio 137 mM, fosfato dibásico de sódio 10 mM e fosfato monobásico de potássio 1,7 mM, pH 7,4) e ressuspendidas no volume final de 1 ml, posteriormente incubadas por 15 minutos a 37 ºC sob agitação, com 20% de SHN como fonte de proteínas do Complemento e em PBS 1x como controle negativo, em um volume final de 1 ml. Após incubação, a ativação do Complemento foi interrompida colocando os tubos no gelo por 1 minuto. As suspensões foram lavadas três vezes com PBS 1x e centrifugadas a 10000*xg* por 10 minutos a 10ºC e ressuspendidas em 1 ml de PBS 1x para serem analisadas por *Western blot* e em 1ml de $NaHCO_3$ 0,1 M, pH 9 quando avaliadas por ELISA. Após as lavagens, as bactérias foram contadas por microscopia sob campo escuro para o uso de 1 x 10^8 bactéria/ml.

A deposição das proteínas do Complemento foi analisada por SDS-PAGE 12% e 15%, *Western Blot* e ELISA, com anticorpos policlonais específicos contra as proteínas do Complemento.

4.6 *Western Blot*

A deposição de proteínas do complemento em superfícies de leptospiras foi analisada em condições redutoras com tampão de amostra 5x (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 100 mM e SDS 2%), aquecidas a 96 ºC por 3 minutos e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Para confecção dos géis utilizamos solução estoque de acrilamida 30%, géis de 1mm de espessura na concentração de 5% de gel de empilhamento e 12% a 15% no gel de separação. As corridas eletroforéticas dos géis foram feitas com tampão Tris-Glicina (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 250 mM, SDS 0,1%) sob voltagem de 120 V, à temperatura ambiente. O padrão de tamanho molecular usado foi o *PageRuler Protein Ladder* (Fermentas).

Para análise por *Western Blot*, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em sistema *Mini-Trans-BlotCell* (*Bio-Rad Laboratories Inc.*, Califórnia, CA, Estados Unidos), por 1 hora a 350 mA. Após transferência,

as membranas para análise das proteínas C5, C6, C7, C8 e C9 foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com PBS 1x, contendo 10% de leite desnatado e Tween 20 0,05% (PBS-T) para bloquear os sítios de ligação inespecíficos após este período, foram realizadas três lavagens das membranas com PBS-T, sendo estas incubadas com anticorpos primários, anti-C5, anti-C6, anti-C7, anti-C8 e anti-C9 em PBS-T com 5% de leite desnatado nas diluições de 1:2500 por 18 horas a 4 ºC, porém para avaliar a deposição da proteína C3, o bloqueio após a transferência foi realizada por 18 horas a 4 °C, com PBS 1x, contendo 10% de leite desnatado e Tween 20 0,05% (PBS-T), após bloqueio, foram realizadas três lavagens das membranas com PBS-T, sendo esta incubada com anticorpo primário anti-C3 diluído em PBS-T com 5% de leite desnatado, nas diluições de 1:5000, por 1 hora a 37ºC. Em seguida, foram feitas três lavagens com PBS-T e todas as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de cabra conjugado à peroxidase, diluídos em PBS-T com 5% de leite desnatado, nas diluições de 1:5000 para a avaliação das proteínas do MAC e 1:10.000 para C3, por 1 hora a 37 ºC. Após três lavagens com PBS-T de todas as memebranas citadas, a revelação foi efetuada com o kit *Enhanced Chemiluminescence System* (ECL, *Amersham*), segundo instruções do fabricante.

4.7 ELISA

A ligação das proteínas do Complemento na superfície bacteriana também foi avaliada por ELISA. Após ressuspender em $NaHCO_3$ 0,1M, pH 9,6, as suspensões bacterianas (1 x 10^8 leptospiras/ml) foram imobilizadas em duplicata em placas de ELISA (Costar 3590 – 96 well, High Binding) por 18 horas a 4 ºC. Os poços foram lavados três vezes com PBS-T e bloqueados com 3% de BSA (Sigma) por 2 horas a 37ºC. As proteínas aderidas às bactérias foram detectadas com anticorpos primários anti-C3, anti-C5, anti-C6, anti-C7, anti-C8, anti-C9 e anti- Neo MAC C5b-9 diluídos em PBS 1 x contendo 1% de BSA, nas diluições 1:5000, incubados por 1 hora a 37 ºC. Em seguida, foram realizadas três lavagens com PBS-T e posteriormente o anticorpo secundário anti-IgG de cabra conjugado à peroxidase, diluído em PBS 1x contendo 1% de BSA foi adicionado a cada poço, na diluição de 1:10000, as placas incubadas novamente por 1 hora a 37 ºC. As placas foram lavadas por três vezes em PBS-T e adicionados o substrato dihidrocloreto de orto-fenilenodiamina (OPD, Sigma) 0,04% diluído em tampão citrato fosfato pH 5,0 (citrato de sódio dibásico 0,1 M e fosfato de sódio monobásico 0,2 M) e 0,01% de H_2O_2 30% (Merck) para a revelação. Após 5 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H_2SO_4 4 N. A absorbância a 492 nm foi lida em leitor de microplacas (*Labsystems Uniscience, Multiskan* EX).

4.8 Análise Estatística

Os resultados de sobrevivência com os quelantes da estirpe não patogênica Patoc e da estirpe patogênica Fromm foram analisados por ANOVA três fatores (soro, com e sem SHN; dose, 5mM e 10mM; quelantes, EDTA e EGTA) seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. As demais estirpes patogênicas, inclusive a estirpe Fromm, incubadas com SHN, SHNi e SHN+EDTA e EGTA 10 mM foram analisadas empregando-se ANOVA um fator, seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O ensaio de sobrevivência com SHN, SHNi e SHN tratados com quelantes e o ensaio de sobrevivência com soros depletados com estirpes não patogênicas foram analisados empregando-se ANOVA dois fatores (estirpes, Patoc e Andamana; tratamentos, SHN, SHNi, SHN+EDTA 10mM e SHN+EGTA 10mM ou SHN, SHNi, SHN+EDTA 10mM e os soros depletados), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. Por fim, os ensaios de deposição por ELISA foram analisados empregando-se ANOVA um fator (estirpes) seguido por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi $p<0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no Setor de Estatística do ICB-USP pela Sra. Rosana Duarte Prisco.

5 Resultados

5.1 Avaliação da interferência de EDTA e EGTA na susceptibilidade de leptospiras aos soros tratados com tais quelantes

Como citado anteriormente, leptospiras não patogênicas são sensíveis ao tratamento *in vitro* com SHN, enquanto as patogênicas são resistentes (Meri et al., 2005). Neste trabalho, ampliamos o número de tipos de leptospiras avaliados, conforme descrito em Material e Métodos **(Tabela 1)**. Decidimos também investigar a contribuição das três vias de ativação para a eliminação *in vitro* de leptospiras. Inicialmente tratamos SHN com os quelantes EDTA ou EGTA. O EDTA inativa as três vias de ativação, pois sequestra os íons Ca^{2+} e Mg^{2+}. Já o EGTA sequestra principalmente Ca^{2+}, sendo usado para inativar a Via Clássica e a Via das Lectinas.

Para eliminar a possibilidade de efeitos tóxicos do EDTA e EGTA diretamente sobre estas bactérias, determinamos a porcentagem de sobrevida na presença desses quelantes nas concentrações de 5 e 10 mM cada.Como mostrado nas **Figuras 6 e 7**, não observamos morte de leptospiras não patogênicas (*L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I) e patogênicas (*L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm), quando incubadas nessas concentrações. Em seguida, tratamos SHN com EDTA ou EGTA, ambos nas concentrações finais de 5 e 10 preparados em meio de cultura das leptospiras (EMJH-BSA). Conforme mostrado na **Figura 6**, o tratamento de SHN com 10 mM de EDTA permitiu que aproximadamente 83% da suspensão de leptospiras não patogênicas sobrevivessem, enquanto com o tratamento com SHN+EGTA 10 mM aproximadamente 45% sobreviveram. A porcentagem de leptospiras mortas quando incubadas com SHN+EDTA 5 mM ou SHN+EGTA 5 mM foi significativamente maior do que quando incubadas com SHN tratadas com os mesmos quelantes na concentração de 10 mM. Não houve diferença estatística quando leptospiras patogênicas foram incubadas com SHN, SHN+EDTA, SHN+EGTA **(Figura 7)**.

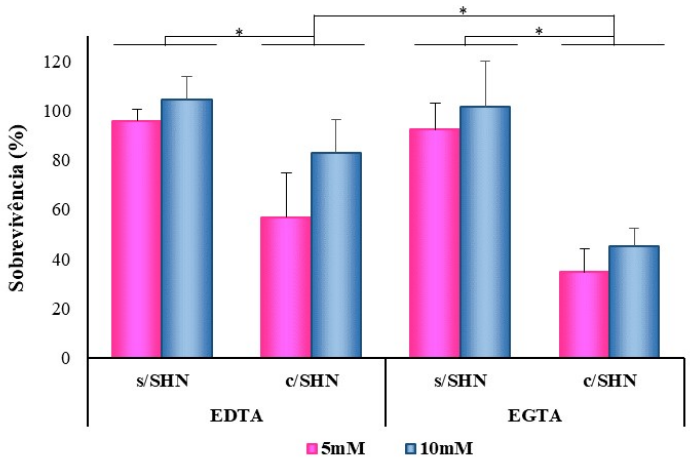
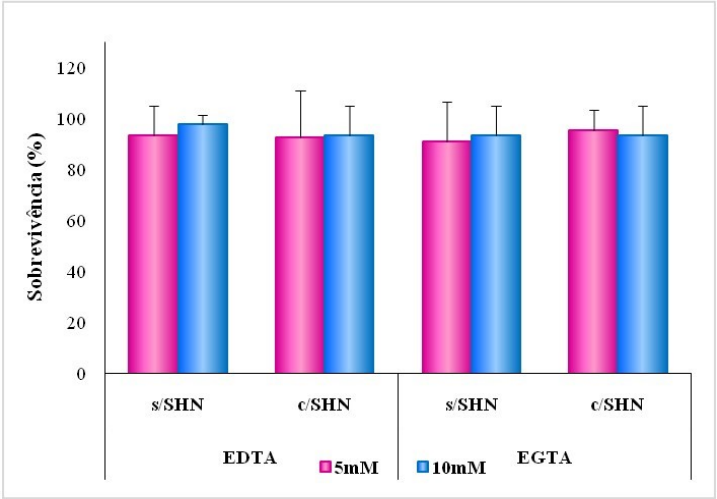


Figura 6- Sobrevida de leptospira não patogênica na presença de quelantes e soros tratados com EDTA e EGTA. As sensibilidades ao EDTA e EGTA e soros tratados com ambos os quelantes foram avaliadas com *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, em diferentes concentrações dos quelantes (5 e 10 mM), bem como, o soro humano normal (SHN) tratado: com diferentes concentrações de EDTA e EGTA (5 e 10 mM). Consideramos as contagens obtidas com o tratamento com SHNi como 100%. Resultados de 4 experimentos. Quelante x Soro x Dose, p=0,471; Soro x Dose, p=0,138; Quelante x Dose, p=0,489; Quelante x Soro, p=0,002 (Tukey, EDTA+SHN≠EDTA e EGTA+SHN; EGTA+SHN≠EGTA, independente da Dose, p<0,05); Dose, p=0,004 (10mM≠5mM, independente do Quelante e do Soro).

Quando comparamos as duas estirpes não-patogênicas *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I e *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11, observamos que houve uma diferença significativa de sobrevivência entre Andamana e Patoc, independente do tratamento do soro com os quelantes. As duas estirpes incubadas com SHN+EDTA (aproximadamente 89% e 83%, respectivamente) e SHN+EGTA (aproximadamente 60% e 50%, respectivamente) sobreviveram em maior porcentagem do que quando comparadas com SHN (aproximadamente 6% e 0%), mostrando que ambos os tratamentos bloquearam as respectivas vias do Complemento como citadas anteriormente (**Figura 8**). No entanto, há necessidade de repetirmos estes experimentos com concentrações superiores de EGTA, para garantir efetivamente que as Vias Clássica e das Lectinas foram bloqueadas. Observamos também que quando tratamos o SHN+EDTA 10 mM a porcentagem de sobrevivência dessas leptospiras é semelhante à porcentagem encontrada quando tratadas com SHNi, confirmando então, a importância do Sistema Complemento para a eliminação dessas bactérias.

a)



b)

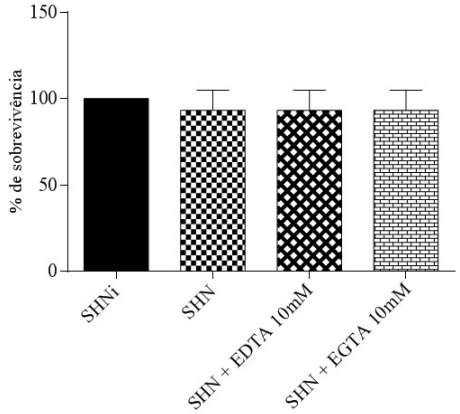


Figura 7 - Sobrevida de leptospira patogênica na presença de quelantes e soros tratados com EDTA e EGTA. Sensibilidades ao EDTA e EGTA e soros tratados com ambos os quelantes foram avaliados com *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, em diferentes concentrações (5 e 10 mM), bem como, com 40% de soro humano normal (SHN) tratado: com diferentes concentrações de EDTA e EGTA (5 e 10 mM). Comparamos as contagens obtidas com SHNi (100%). Resultado de 3 experimentos, a) ANOVA três fatores: Quelante x SHN x Dose, p=0,955; SHN x Dose, p=0,682; Quelante x Dose, p=0,792; Quelante x SHN, p=0,616; Dose, p=0,784; SHN, p=0,972; Quelante, p=856. b) ANOVA um fator: Grupos, p=0,802.

As espécies patogênicas mantiveram-se resistentes tanto na presença de SHN sem tratamento prévio quanto com SHN+EDTA ou com SHN+EGTA, exceto a estirpe Pomona **(Figura 9a)** que apresentou uma diferença em sua resistência, quando incubada com SHN+EDTA (**Figuras 7 e 9**).

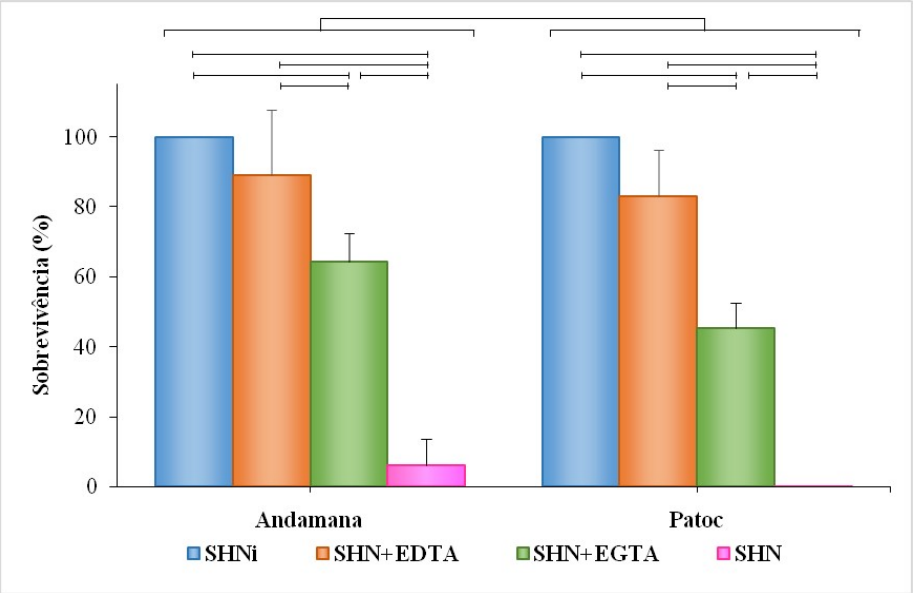


Figura 8 - Resistência ao soro de estirpes não patogênicas de *Leptospira.* A sensibilidade ao soro foi avaliada com *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11 e *L.biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I comparando-se as contagens de amostras incubadas com 40% SHN, SHN+EDTA 10 mM ou SHN + EGTA 10 mM, com SHNi (100%). Resultados de 4 experimentos, ANOVA dois fatores: Estirpe x Quelante, p=0,208; Estirpe, Andamana≠Patoc, independente do Quelante, p=0,011; Quelante, p<0,001 (Tukey, SHN+EDTA10mM≠SHN e SHN+EGTA 10mM; SHN+EGTA 10mM≠SHN e SHNi; SHNi≠SHN, independente da Estirpe, p<0,05).

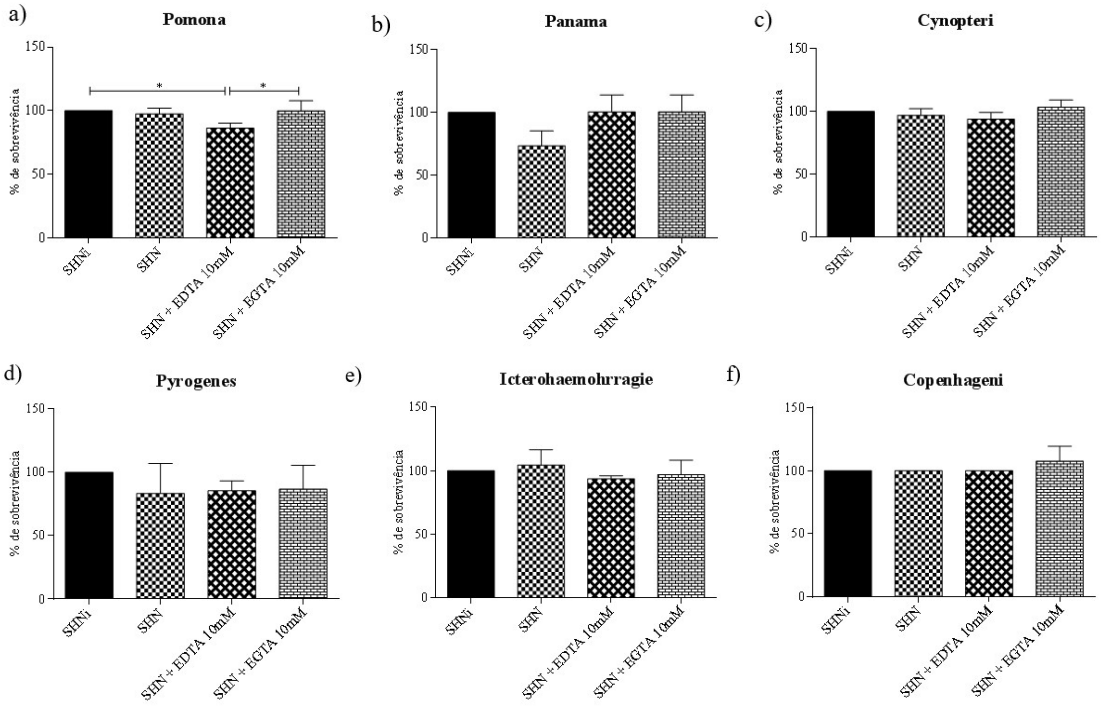


Figura 9 - Resistência de diferentes tipos de leptospiras patogênicas incubadas com soro. A sensibilidade ao soro foi avaliada com a) *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona. n= 3 experimentos, ANOVA um fator: Grupos, p=0,026 (Tukey, SHN+EDTA10mM≠SHN+EGTA10mM e SHNi, p<0,05). b) *L. noguchi* sorovar Panama estirpe CZ 214. n=4 experimentos, ANOVA um fator: Grupos, p=0,198. c) *L. kirshneri* sorovar Cynopteri estirpe 3522 C. n=4 experimentos, ANOVA um fator: Grupos, p=0,533. d) *L. interrogans* sorovar Pyrogenes estirpe Salinen. n=4 experimentos, ANOVA um fator: Grupos, p=0,720. e) *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe RGA. n=4 experimentos, ANOVA um fator: Grupos, p=0,450. f) *L. interrogan*s sorovar Copenhageni estirpe 10A. n= 3 experimentos, ANOVA um fator: Grupos, p=0,350. Comparando-se as contagens de amostras incubadas com 40% de SHN, SHN+EDTA 10 mM ou SHN + EGTA 10 mM, comSHNi (100%).

5.2 Avaliação de susceptibilidade a soros depletados com as estirpes não patogênicas

Como mostrado anteriormente (**Figura 8)**, as leptospiras não patogênicas tratadas com SHN+EGTA 10 mM tiveram uma taxa de sobrevivência menor do que quando tratadas com SHNi e SHN+EDTA 10 mM. Assim, questionamos se a Via Alternativa seria única para a eliminação desta espécie, pois os dados apresentados mostram sobrevida de aproximadamente 40% de *L. biflexa* sorovares Patoc e Andamana, indicando que a morte foi causada, pelo menos em parte pela Via Alternativa.

Para continuar a avaliar a importância de cada via do Sistema Complemento na morte das estirpes Patoc e Andamana, utilizamos soros depletados ou soro de paciente deficiente. Assim, empregamos soro depletado de C1q (para avaliar a contribuição da Via Clássica), soro de paciente deficiente de MBL (Via das Lectinas), soro depletado de FD (Via Alternativa) e por fim os soros depletados de C8 e C9 (Via Terminal Comum). Como as espécies

patogênicas mostraram-se resistentes às condições desafiadas anteriormente, a sobrevivência na presença desses soros depletados não foi avaliada.

As leptospiras não patogênicas apresentaram uma baixa sobrevida com os soros depletados de C1q, FD e deficiente de MBL quando comparadas com a porcentagem de sobrevida das estirpes incubadas com SHNi **(Figura 10)**. Interessantemente, a sobrevivência das leptospiras quando incubadas com soro deficiente em MBL foi significativamente maior (aproximadamente 43%) do que quando comparadas com soros depletados de C1q (aproximadamente 15%) e FD (aproximadamente 6%), sugerindo que a Via das Lectinas possa ser importante também para o reconhecimento e ativação do Sistema Complemento durante a infecção com tais espiroquetas. No entanto, há que se considerar que o soro de paciente deficiente de MBL pode apresentar ficolinas em concentrações normais, podendo ainda ativar a Via das Lectinas, mesmo que parcialmente. As leptospiras não patogênicas sobrevivem igualmente quando incubadas com soros depletados de C8 ou de C9, SHNi ou SHN+EDTA 10 mM, mostrando que o MAC é responsável pela eliminação *in vitro* da leptospira pela sua ação lítica, independente da estirpe de leptospiras não patogênicas.

5.3 Avaliação da deposição das proteínas do Complemento na superfície das leptospiras

Uma das finalidades deste estudo foi avaliar em maior número de espécies de leptospiras a deposição de C3 e de moléculas que compõem o MAC, já que a presença dessas proteínas e/ou seus fragmentos reflete a ativação do Sistema Complemento sobre estas espiroquetas. Para confirmar se há diferença de deposição entre espécies patogênicas e não patogênicas, as nove estirpes de leptospiras (conforme **Tabela 1**) foram incubadas durante 15 min, com 20% de SHN, como fonte das proteínas C3, C5, C6, C7, C8 e C9 e as interações foram analisadas por *Western blot* e ELISA, empregando anticorpos específicos contra cada componente estudado.

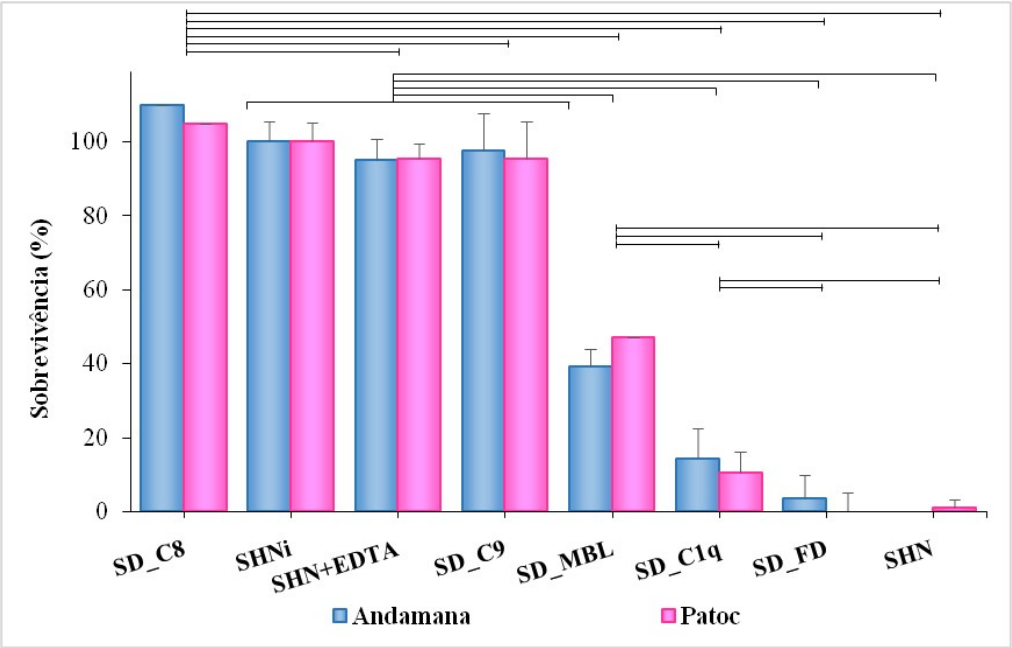


Figura 10 - Sobrevivência de leptospiras não patogênicas na presença de soros depletados. *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I e *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11, foram incubadas com 40% de SHNi, SHN, SHN+EDTA 10 mM, soro deficiente em MBL (SD-MBL), ou soro depletado de C8 (SD-C8), ou de C9 (SD-C9), ou de C1q (SD-C1q) ou de Fator D (SD-FD), incubou-se durante 120 minutos. Os resultados são apresentados como a sobrevivência em relação à sobrevida de bactérias em soro inativado pelo calor (100%). n=4 experimentos, ANOVA dois fatores: Estirpe x Tratamento, p=0,411; Estirpe, p=0,803; Tratamento, p<0,001 (Tukey, SHN, SD-FD, SD-C1q e SD-MBL ≠SHNi; SD-C1q, SD-MBL, SD-C9, SD-C8 e SHN+EDTA 10mM≠SHN; SD-FD, SD-C1q, SD-MBL e SD-C8≠SHN+EDTA 10mM; SD-C1q, SD-C9, SD-FD e SD_MBL≠SD-C8; SD-C1q, SD-FD e SD-MBL≠SD-C9; SD-FD e SD-MBL≠C1q; SD-FD≠SD-MBL, independente da Estirpe, p<0,05)

Como observado na **Figura 11**, além das bandas de peso molecular de aproximadamente 185 kDa, representando C3 não reduzido completamente, 110 kDa (cadeia α) e 75 kDa (cadeia β), com algumas espécies podemos observar também a presença de uma banda de aproximadamente 40 kDa (fragmento da cadeia α'de iC3b). A presença deste fragmento sugere ativação do Sistema Complemento. Quanto à deposição das demais proteínas C5, C6, C7, C8 e C9 **(Figuras 12 a 16)**, observamos a presença de banda mais intensa nas estirpes saprófitas *L. biflexa* sorovar Patoc e Andamana e bandas de intensidades variáveis nas demais espécies estudadas.

Como não observamos claramente por *Western blot* a deposição de C5, C6, C7, C8 e C9 nas espécies patogênicas mencionadas, resolvemos avaliar esta possível interação por ELISA, por ser uma técnica quantitativa e mais sensível que a primeira. Conforme ilustrado na **Figura 17**, não foram observadas diferenças significativas da deposição do componente C3 ou seus fragmentos dentre os diferentes tipos de leptospiras. Já a interação das proteínas C6 e C7 **(Figuras 18b e 19a)** foi mais acentuada nas duas estirpes não patogênicas, quando

comparadas com as demais espécies, sendo que há uma diferença significativa entre ambas quanto a deposição de proteína C7. No entanto, somente a *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11 apresentou maior deposição dos componentes C5, C8 e C9 **(Figuras 18a, 19b e 20)**, quando comparada com a *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I e espécies patogênicas.

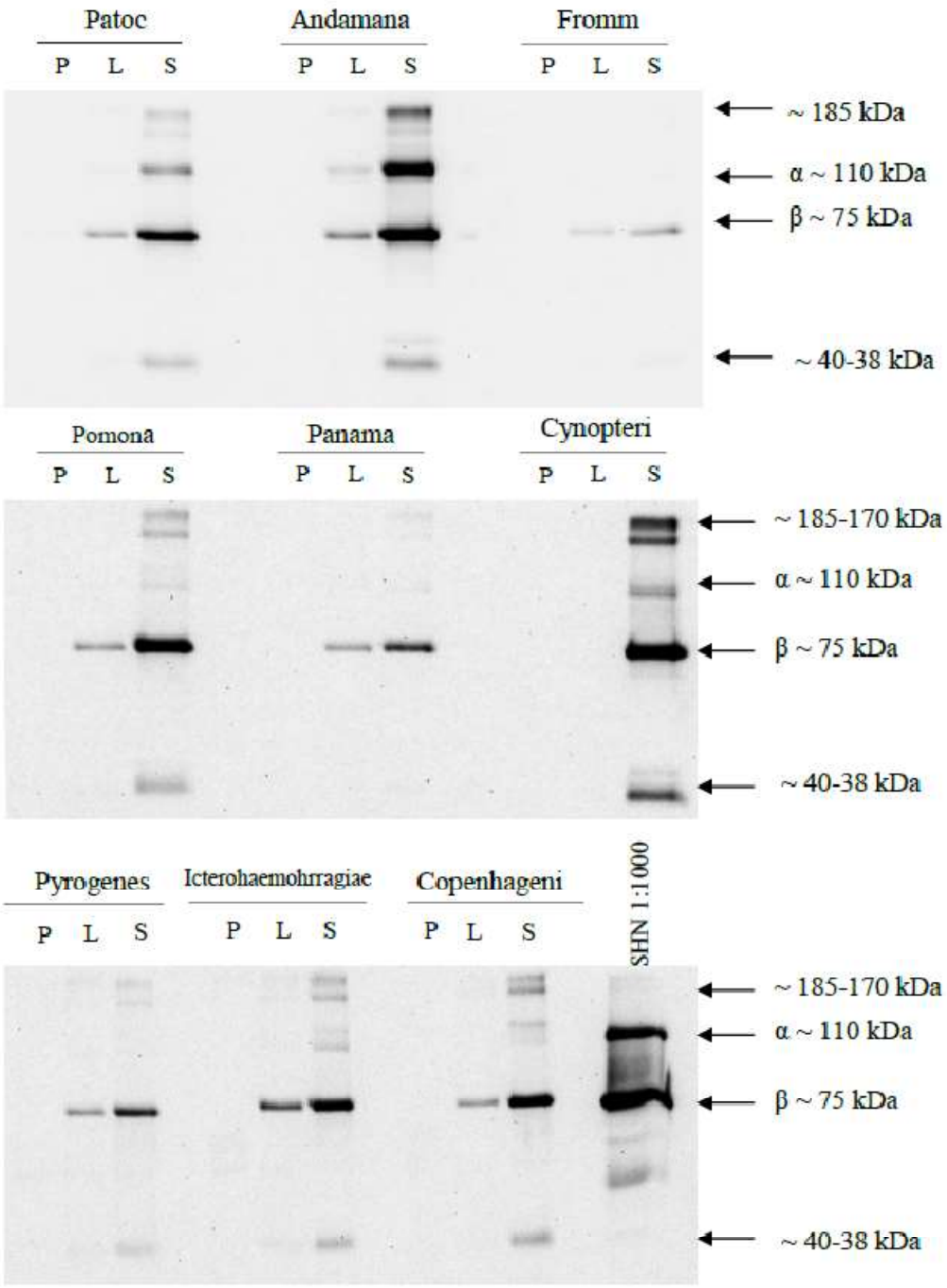


Figura 11 – Interação de leptospiras não patogênicas e patogênicas com C3. *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11, *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, *L. noguchi* sorovar Panama estirpe CZ 214, *L. kirshneri*sorovar Cynopteri estirpe 3522 C, *L. interrogans* sorovar Pyrogenes estirpe Salinen, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe RGA e *L. interrogan*s sorovar Copenhageni estirpe 10A foram incubadas com (P) PBS e (S) SHN. (L) alíquota da última lavagem. As nove estirpes foram incubadas com 20% de SHN ou com PBS por 15 minutos. Após várias lavagens, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE em condições redutoras, transferidos para membranas de nitrocelulose e tratadas com anti-C3 humano, e posteriormente com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase. O controle da reação sem bactéria é representado pelo SHN (1:1000).

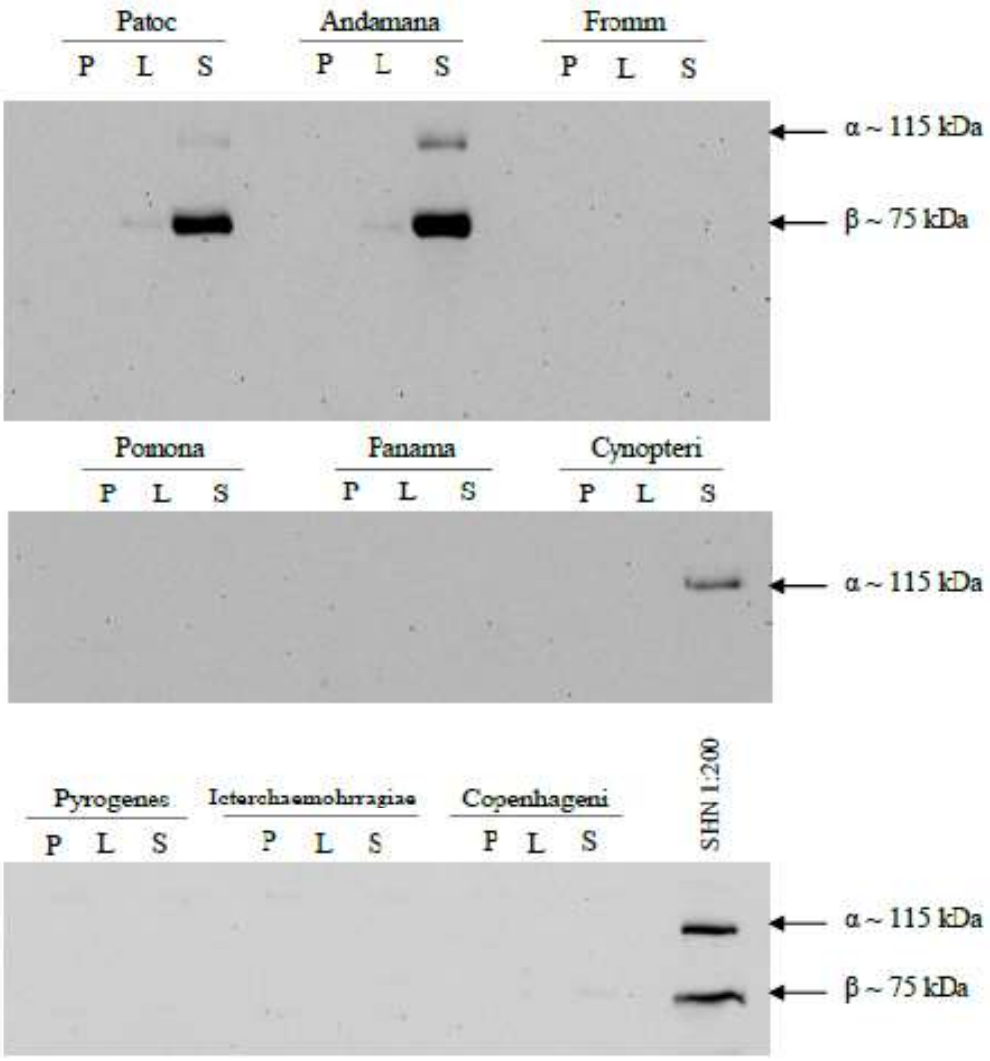


Figura 12 – Interação de leptospiras não patogênicas e patogênicas com C5. *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11, *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, *L. noguchi* sorovar Panama estirpe CZ 214, *L. kirshneri*sorovar Cynopteri estirpe 3522 C, *L. interrogans* sorovar Pyrogenes estirpe Salinen, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe RGA e *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 10A foram incubadas com (P) PBS e (S) SHN. (L) alíquota da última lavagem. As nove estirpes foram incubadas com 20% de SHN ou com PBS por 15 minutos. Após várias lavagens, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE em condições redutoras, transferidos para membranas de nitrocelulose e tratadas com anti-C5 humano, e posteriormente anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase. O controle da reação sem bactéria é representado pelo SHN (1:200).

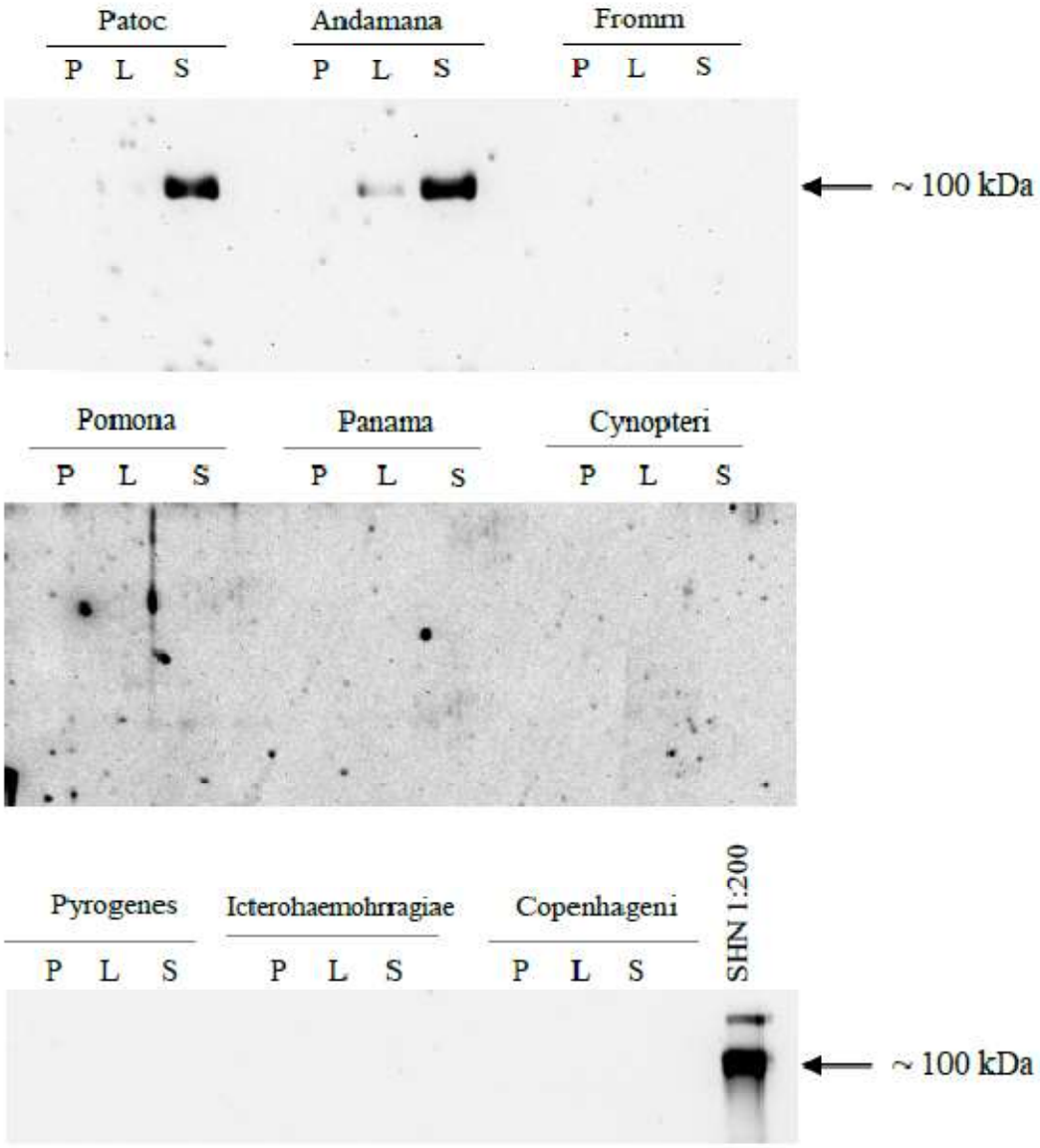


Figura 13 - Interação de leptospiras não patogênicas e patogênicas com C6. *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11, *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, *L. noguchi* sorovar Panama estirpe CZ 214, *L. kirshneri*sorovar Cynopteri estirpe 3522 C, *L. interrogans* sorovar Pyrogenes estirpe Salinen, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe RGA e *L. interrogan*s sorovar Copenhageni estirpe 10A foram incubadas com (P) PBS e (S) SHN. (L) alíquota da última lavagem. As nove estirpes foram incubadas com 20% de SHN ou com PBS por 15 minutos. Após várias lavagens, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE em condições redutoras, transferidos para membranas de nitrocelulose e tratadas com anti-C6 humano, e posteriormente anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase. O controle da reação sem bactéria é representado pelo SHN (1:200).

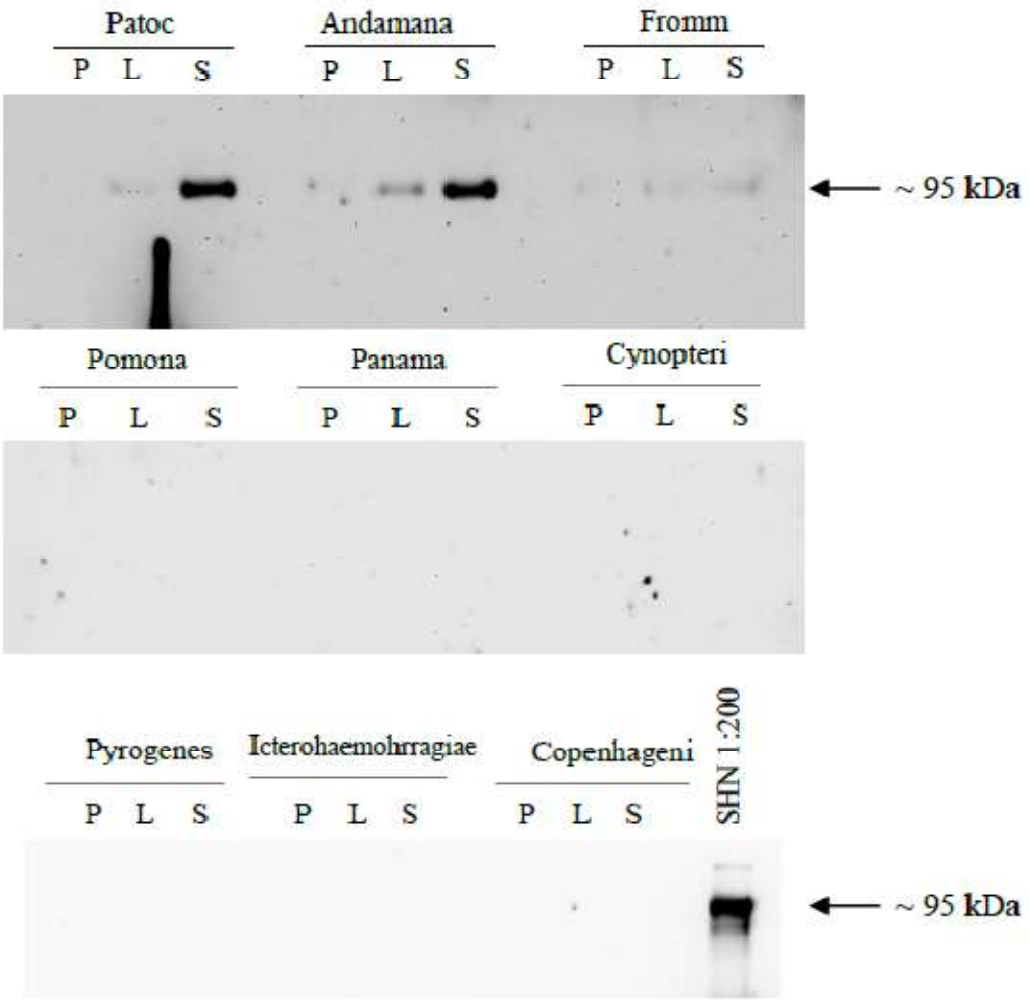


Figura 14 - Interação de leptospiras não patogênicas e patogênicas com C7. *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11, *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, *L. noguchi* sorovar Panama estirpe CZ 214, *L. kirshneri* sorovar Cynopteri estirpe 3522 C, *L. interrogans* sorovar Pyrogenes estirpe Salinen, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe RGA e *L. interrogan*s sorovar Copenhageni estirpe 10A foram incubadas com (P) PBS e (S) SHN. (L) alíquota da última lavagem. As nove estirpes foram incubadas com 20% de SHN ou com PBS por 15 minutos. Após várias lavagens, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE em condições redutoras, transferidos para membranas de nitrocelulose e tratadas com anti-C7 humano, e posteriormente anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase. O controle da reação sem bactéria é representado pelo SHN (1:200).

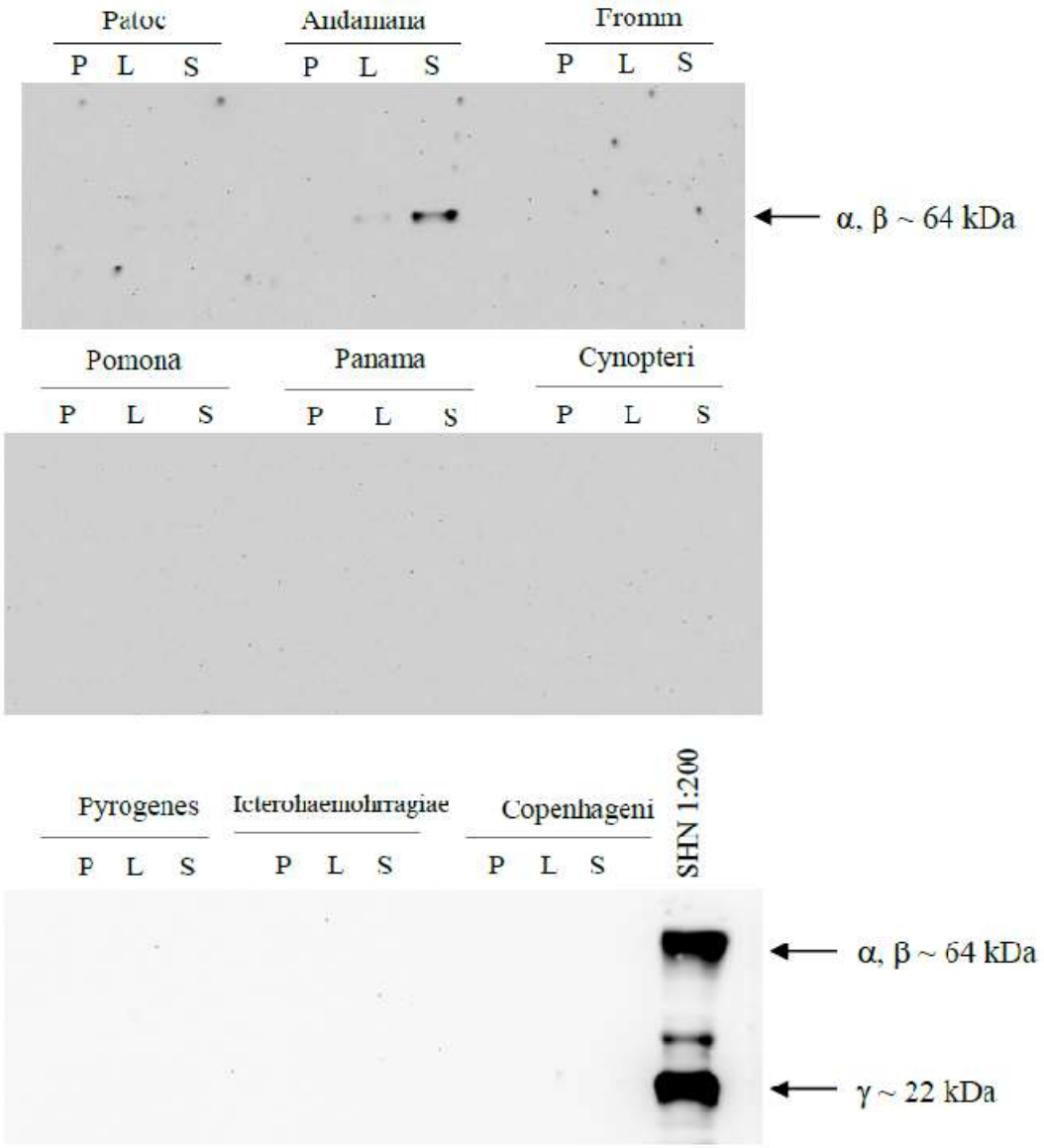


Figura 15 – Interação de leptospiras não patogênicas e patogênicas com C8. *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11, *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, *L. noguchi* sorovar Panama estirpe CZ 214, *L. kirshneri*sorovar Cynopteri estirpe 3522 C, *L. interrogans* sorovar Pyrogenes estirpe Salinen, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe RGA e *L. interrogan*s sorovar Copenhageni estirpe 10A foram incubadas com (P) PBS e (S) SHN. (L) alíquota da última lavagem. As nove estirpes foram incubadas com 20% de SHN ou com PBS por 15 minutos. Após várias lavagens, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE em condições redutoras, transferidos para membranas de nitrocelulose e tratadas com anti-C8 humano, e posteriormente anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase. O controle da reação sem bactéria é representado pelo SHN (1:200).

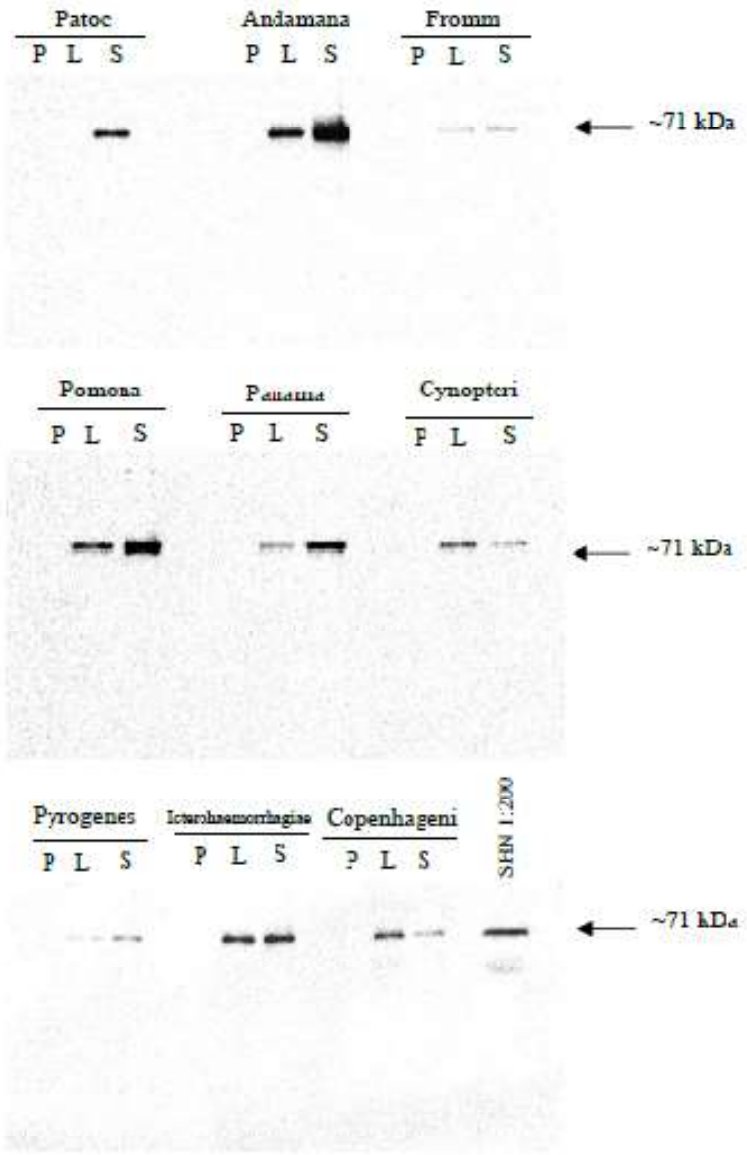


Figura 16 - Interação de leptospiras não patogênicas e patogênicas com C9. *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11, *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, *L. noguchi* sorovar Panama estirpe CZ 214, *L. kirshneri*sorovar Cynopteri estirpe 3522 C, *L. interrogans* sorovar Pyrogenes estirpe Salinen, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe RGA e *L. interrogan*s sorovar Copenhageni estirpe 10A foram incubadas com (P) PBS e (S) SHN. (L) alíquota da última lavagem. As nove estirpes foram incubadas com 20% de SHN ou com PBS por 15 minutos. Após várias lavagens, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE em condições redutoras, transferidos para membranas de nitrocelulose e tratadas com anti-C9 humano, e posteriormente anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase. O controle da reação sem bactéria é representado pelo SHN (1:200).

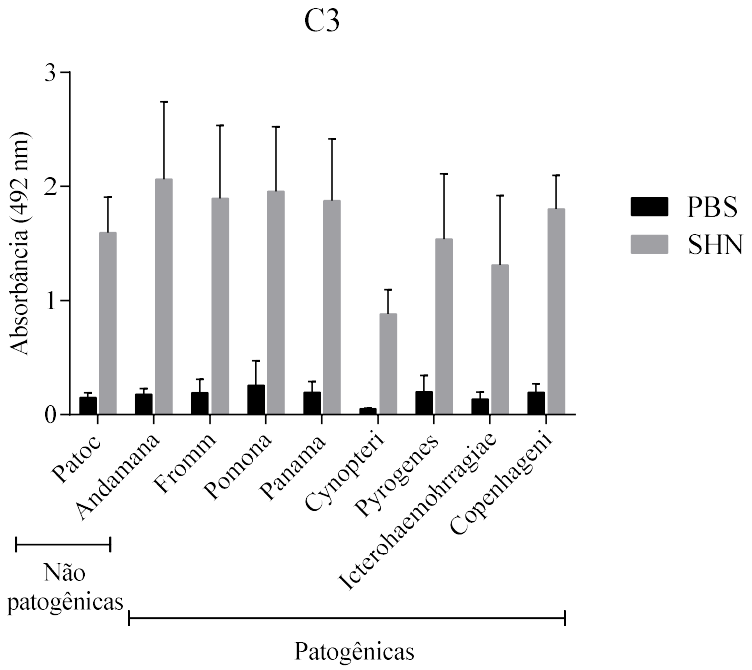


Figura17 - Níveis de deposição de C3 em nove estirpes de *Leptospira* analisada por ELISA. As estirpes *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11, *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, *L. noguchi* sorovar Panama estirpe CZ 214, *L. kirshneri* sorovar Cynopteri estirpe 3522 C, *L. interrogans* sorovar Pyrogenes estirpe Salinen, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe RGA e *L. interrogan*s sorovar Copenhageni estirpe 10A, foram incubadas com 20% de SHN ou em PBS, a 37 °C durante 15 minutos. Após extensas lavagens, foram utilizados $1x10^8$ leptospiras/ml para revestir os poços de placa de ELISA. A absorbância foi medida a 492 nm. n= 4 experimentos, ANOVA um fator: Estirpe, p=0,073.

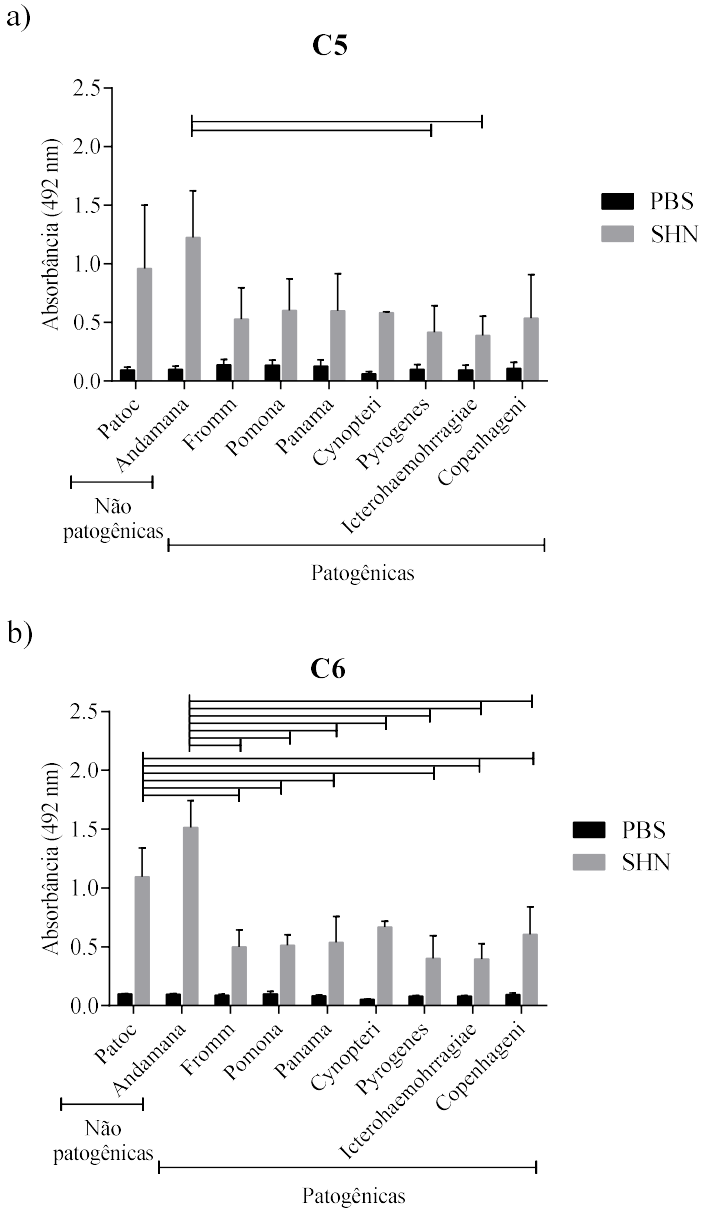


Figura 18 - Níveis de deposição de C5e C6 em nove estirpes de *Leptospira* analisada por ELISA. As estirpes *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11, *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, *L. noguchi* sorovar Panama estirpe CZ 214, *L. kirshneri* sorovar Cynopteri estirpe 3522 C, *L. interrogans* sorovar Pyrogenes estirpe Salinen, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe RGA e *L. interrogan*s sorovar Copenhageni estirpe 10A, foram incubadas com 20% de SHN ou em PBS, a 37 °C durante 15 minutos. Após extensas lavagens, foram utilizados $1x10^8$ leptospiras/ml para revestir os poços de placa de ELISA. A absorbância foi medida a 492 nm. a) n= 4 experimentos, ANOVA um fator: Estirpe, p=0,018 (Tukey, Andamana ≠ Icterohaemohrragiae e Pyrogenes, p<0,05). b) n= 4 experimentos, ANOVA um fator: Estirpe, p<0,001 (Tukey, Patoc ≠ Fromm, Pomona, Panama, Pyrogenes, Icterohaemohrragiae, Copenhageni; Andamana ≠ Fromm, Pomona, Panama, Cynopteri, Pyrogenes, Icterohaemohrragiae e Copenhageni, p<0,05).

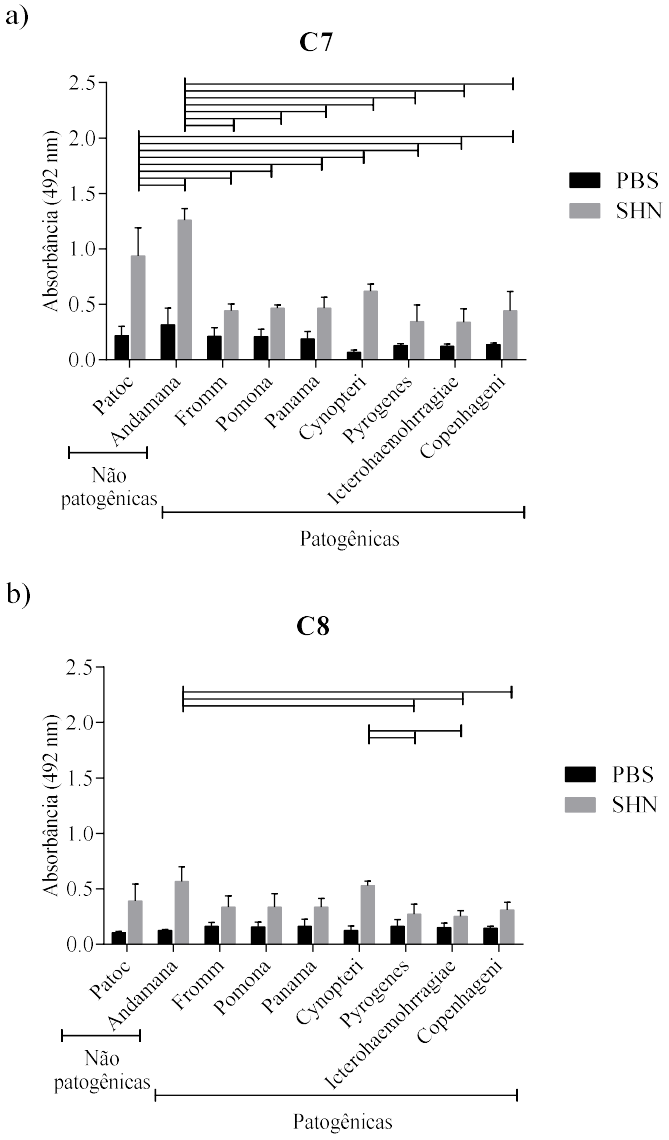


Figura 19 - Níveis de deposição de C7e C8 em nove estirpes de *Leptospira* analisada por ELISA. As estirpes L. biflexa sorovar Patoc estirpe Patoc I, L. biflexa sorovar Andamana estirpe CH11, L. interrogans sorovar Kennewicki estirpe Fromm, L. interrogans sorovar Pomona estirpe Pomona, L. noguchi sorovar Panama estirpe CZ 214, L. kirshneri sorovar Cynopteri estirpe 3522 C, L. interrogans sorovar Pyrogenes estirpe Salinen, L. interrogans sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe RGA e L. interrogans sorovar Copenhageni estirpe 10A, foram incubadas com 20% de SHN ou em PBS, a 37 °C durante 15 minutos. Após extensas lavagens, foram utilizados 1x108 leptospiras/ml para revestir os poços de placa de ELISA. A absorbância foi medida a 492 nm. a) n= 4 experimentos, ANOVA um fator: Estirpe, $p<0,001$ (Tukey, Patoc ≠ Andamana, Fromm, Pomona, Panama, Cynopteri, Pyrogenes, Icterohaemohrragiae, Copenhageni; Andamana ≠ Fromm, Pomona, Panama, Cynopteri, Pyrogenes, Icterohaemohrragiae e Copenhageni, $p<0,05$). b) n= 4 experimentos, ANOVA um fator: Estirpe, $p<0,001$ (Tukey, Andamana≠Copenhageni, Icterohaemohrragiae e Pyrogenes, Cynopteri ≠ Icterohaemohrragiae e Pyrogenes, $p<0,05$).

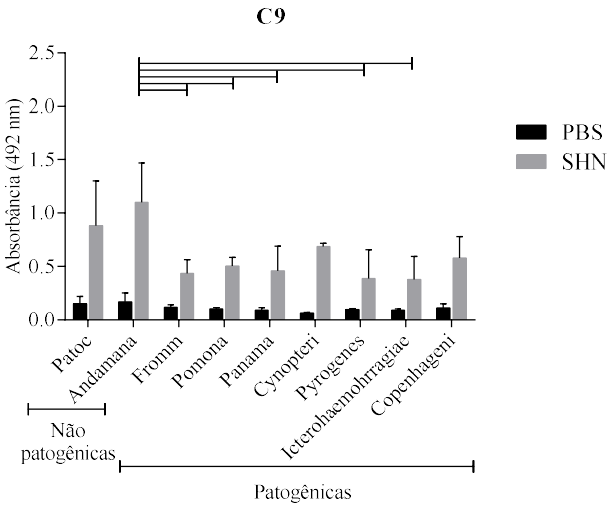


Figura 20 - Níveis de deposição de C9em nove estirpes de *Leptospira* analisada por ELISA. As estirpes *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11, *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, *L. noguchi* sorovar Panama estirpe CZ 214, *L. kirshneri* sorovar Cynopteri estirpe 3522 C, *L. interrogans* sorovar Pyrogenes estirpe Salinen, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe RGA e *L. interrogan*s sorovar Copenhageni estirpe 10A, foram incubadas com 20% de SHN ou em PBS, a 37 °C durante 15 minutos. Após extensas lavagens, foram utilizados $1x10^8$ leptospiras/ml para revestir os poços de placa de ELISA. A absorbância foi medida a 492 nm. n= 4 experimentos, SHN: ANOVA um fator: Estirpe, p=0,003 (Tukey, Andamana≠Fromm, Pomona, Panama, Pyrogenes, e Icterohaemohrragiae, p<0,05)

6 Discussão

Johnson e Muschel (1965) pela primeira vez observaram que leptospiras não patogênicas morriam na presença de soro humano, mas sobrevivam se o soro fosse previamente inativado pelo calor. Por outro lado, espécies patogênicas eram mais resistentes ao tratamento com SHN. Outras bactérias Gram-negativas foram também descritas como resistentes ao soro: algumas estirpes de *Escherichia coli* (Vosti, Randall, 1970; McCabe et al., 1978), *Klebsiella* (Benge, 1988), *Serratia marcescens* (Simberkoff et al., 1976), *Pseudomonas aeruginosa* (Borowski, Schiller, 1983), *Neisseria gonorrhoeae* (Schoolnik et al., 1976; Eisenstein et al., 1977) e *Vibrio vulnificus* (Johnson et al., 1984). Trabalhos subsequentes demostraram que muitas espécies de bactérias Gram-negativas em geral são eliminadas pela ação lítica que envolve componentes do Sistema Complemento (revisado em Rowley, Wardlaw, 1958; Johson, Harris, 1967). No entanto, algumas apresentam fatores de virulência que permitem a evasão deste sistema de defesa do hospedeiro (Benge, 1988).

Os mecanismos de evasão imune permitem a disseminação e colonização de leptospiras patogênicas em diversos órgãos do hospedeiro, além da conhecida propriedade de interagirem com componentes da matriz extracelular (Johnson, Harris, 1967; Merien et al., 2000; Meri et al., 2006; Stevenson et al., 2007). Para que as leptospiras patogênicas sobrevivam aos mecanismos líticos do Sistema Complemento, elas precisam adquirir reguladores, principalmente da fase fluida do hospedeiro, depositando-os sobre sua própria superfície, como inicialmente demonstrado por Meri et al. (2005) a exemplo das *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Wijnberg, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe 142, *L. interrogans* sorovar Zanoni estirpe Zanoni, *L. borgpeterseni* sorovar Sejroe estirpe Topino I, *L. borgpeterseni* sorovar Mini estirpe Sari, *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I. O mesmo mecanismo foi observado pelo nosso grupo (Barbosa et al., 2009) para as leptospiras*L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I, *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, *L. borgpetersenii* sorovar Javanica estirpe Veldrat Bataviae 46, *L. kirshneri* sorovar Cynopteri estirpe 3522 C, *L. noguchi* sorovar Panama estirpe CZ 214K (Barbosa et al., 2009).

Outro mecanismo utilizado pela leptospira patogênica para evasão é a secreção de proteases que clivam as principais proteínas do Sistema Complemento (Fraga et al., 2014). Em acordo com este conceito, Amamura et al. (2017), demonstraram *L. interrogans* sorovar

Kennewicki estirpe Fromm tiveram a sobrevida reduzida para 60% quando incubadas na presença de SHN tratado com 1,10,fenantrolina, conhecido inibidor de metaloproteases.

Dentre as leptospiras, a *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm mostrou ser resistente a todos os tratamentos realizados neste trabalho, possivelmente pelos dois mecanismos citados acima, sendo este resultado reproduzido também com *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, *L. noguchi* sorovar Panama estirpe CZ 214, *L. kirshneri* sorovar Cynopteri estirpe 3522 C, *L. interrogans* sorovar Pyrogenes estirpe Salinen, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae estirpe RGA e *L. interrogan*s sorovar Copenhageni estirpe 10A.

Barbosa et al. (2009) mostraram que *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona é parcialmente resistente à ação do Complemento, porém neste trabalho, notamos que a sobrevivência na presençade SHN foi semelhante àquela observada com SHNi **(Figura 9a)**. Quando a sobrevida de leptospira na presença de SHN+EDTA foi comparada com SHNi, observamos uma diferença estatística significativa, contudo a porcentagem de morte foi menor que 10%. Também avaliamos os demais sorovares de espécies patogênicas atenuadas **(Figura 9b ao 9f)** que se comportaram como a *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm, não demonstrando nenhuma diferença na porcentagem de sobrevida. Essa possível diferença da Pomona com as demais espécies patogênicas pode ser sugerida pela forma como elas são mantidas em laboratório, pois a *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm mantém a sua virulência pelas passagens em hamsters, enquanto os demais sorovares são atenuados por várias passagens de cultura *in vitro*, como citado em Material e Métodos **(item 4.1)**, podendo possívelmente apresentar mutações de proteínas de superfície de membrana nestas estirpes. Outra hipótese pode ser de que estas possíveis mutações no sorovar Pomona, o tornem sensível ao EDTA, fazendo com que morram mais bactérias em sua presença.

Até o momento, não foram descritos mecanismos de evasão do Sistema Complemento nas espécies não patogênicas, como observado nas patogênicas, explicando porque quando incubamos tais leptospiras não patogênicas com SHN há rápida eliminação destas. Em cerca de 60 minutos já é possível observar a ação do Sistema Complemento e com 120 minutos, praticamente todas elas foram mortas (Meri et al., 2005; Barbosa et al., 2009), sendo este último tempo de incubação empregado no presente trabalho.

Ao incubar espécies não patogênica e patogênica de leptospiras com quelantes (EDTA e EGTA) **(Figuras 6, 7)**, observamos que ambos não interfiram na taxa de mortalidade de

nenhuma das espécies. Porém, quando a espécie não patogênica foi incubada com SHN+EDTA e SHN+EGTA na concentração de 5 mM, apresentavam alta taxa de mortalidade, pois esta concentração foi insuficiente para bloquear todas as vias do Complemento **(Figura 6)**. Assim, utilizamos a concentração de 10 mM, e observamos que maior número de bactéria não patogênica incubada com SHN+EDTA 10 mM sobreviveu do que quando incubada com SHN+EGTA 10 mM. A porcentagem de sobrevida da espécie patogênica em SHN não foi significativamente diferente da porcentagem de sobrevida em qualquer outro tipo de tratamento.

No presente trabalho, ao incubar as duas estirpes saprófitas com os soros, observamos que na presença de SHN morreram como o esperado e com o SHNi sobreviveram (100%), o que está de acordo com os trabalhos anteriormente citados. Neste experimento foi demonstrada a importância da ativação do Sistema Complemento para a morte de tais leptospiras (**Figura 8)**. Aproximadamente 90% (Andamana) e 83% (Patoc) das estirpes tratadas com SHN+EDTA 10 mM. Aproximadamente 60% (Andamana) e 40% (Patoc) das estirpes tratadas com SHN+EGTA 10 mM sobreviveram **(Figura 8)**, sugerindo que a Patoc (estirpe Patoc I) talvez seja mais sensível que a Andamana (estirpe CH11), provavelmente pela presença de diferentes proteínas de membrana expressas em cada uma delas.

No trabalho de Barbosa et al. (2009) quando a espécie não patogênica foi incubada com soros deficientes de MBL e C1s, os autores observaram a morte de aproximadamente 80% e de 90% dessas bactérias para estes soros respectivamente, sugerindo que a principal via para eliminação das leptospiras pudesse ser a Via Alternativa. No entanto, a porcentagem de sobrevivência de leptospiras não patogênicas na presença de soro depletado de FD **(Figura 10)** ou depletado de FB (Breda et al., 2018) foi semelhante àquela encontrada quando incubadas com SHN. Em outras palavras, considerando os resultados acima, poderíamos sugerir que a Via Alternativa não parece ser a mais importante para a eliminação destas espiroquetas. Entretanto, ao compararmos com os resultados mostrados nas **Figuras 6 e 8**, o tratamento com SHN+EGTA 10 mM reduziu a sobrevivência para aproximadamente 40% Patoc e 60% Andamana, enquanto com SHN praticamente eliminou todas essas leptospiras. Continuaremos a explorar estas observações empregando concentrações de EGTA maiores que 10 mM, que possam talvez melhor assegurar que a Via Alternativa seja a única realmente preservada no SHN+EGTA.

Embora o papel da Via Alternativa para eliminar leptospiras não patogênicas tenha sido sugerido por Meri et al. (2005) e Barbosa et al. (2009), no presente trabalho as duas estirpes não patogênicas empregadas obtiveram valores de sobrevida distintos, quando incubadas com soros depletados de C1q,de FD ou soro deficiente em MBL. Barbosa et al. (2009) mostraram que a *L. biflexa* sorovar Patoc era eliminada quando incubada com soro deficiente de MBL ou deficiente de C1s. No entanto, a participação da Via das Lectinas, não poderia ter sido excluída por completo, uma vez que soro deficiente de MBL ainda apresenta ficolinas 1, 2 e 3 em concentrações suficientes para ativar esta via (0,06-1,07 µg/ml, 3,3-5 µg/ml e 18,4-25 µg/ml, respectivamente) (Hummelshoj, 2005;.Krarup et al., 2005; Munthe-Fog et al., 2007, 2008; Honoré et al., 2008; Rovig et al., 2009). Nas nossas condições, o soro deficiente de MBL permitiu uma sobrevida de 50% **(Figura 10)**. Infelizmente, não tivemos acesso a soro de paciente deficiente de ficolinas para melhor explorar esta questão. Finalmente, as bactérias quando incubadas com soros depletados de C8 e C9 sobreviveram como nas culturas tratadas com SHNi, confirmando que a eliminação destas são afetadas pela ação do MAC.

Em nossas condições a Via Alternativa não foi importante para eliminação da *L. biflexa* sorovares Andamana e Patoc, uma vez que ambas não sobreviveram quando incubadas com soro depletado de FD **(Figura 10)**. Resultados semelhantes foram observados pelo nosso grupo em publicação recente (Breda et al., 2018) onde *L. biflexa* sorovar Patoc igualmente não sobreviveu na presença de soro humano depletado de FB, à semelhança do que ocorre em SHN. Breda et al. (2018) demostraram que a *L. biflexa* sorovar Patoc é capaz de se ligar a C1q e ativar a Via Clássica, independentemente da presença de anticorpos específicos antileptospira.Neste trabalho também utilizamos soro depletado de C1q para incubar as estirpes não patogênicas e avaliar a importância da Via Clássica.Observamos uma taxa de sobrevivência pequena, mas significativa de aproximadamente 10%, um valor maior que quando tratadas com soro depletado de FD e SHN. Resultados semelhantes foram observados por Barbosa et al. (2009) empregando o soro deficiente de C1s. Assim, podemos sugerir que a Via Clássica poderia contribuir minimamente para a morte das leptospiras não patogênicas.

Meri et al. (2005) demonstraram que 15 minutos já seriam tempo suficiente para a deposição das principais proteínas do Sistema Complemento em leptospiras, e que após este período seria atingido um platô. Por esse motivo este tempo foi selecionado para incubar as leptospiras patogênicas e não patogênicas em nossos ensaios de deposição. Em estudos realizados previamente por Barbosa et al. (2009) foi demonstrado diferença na deposição dos

componentes C3, C5, C6, C7, C8 e C9 entre estirpes saprófitas (Patoc I) e patogênicas, por ELISA. Meri et al. (2005) avaliaram a deposição das proteínas C3, C5, C6, C8 e MAC observando diferença em todos estes componentes, exceto C3. No presente trabalho foi avaliada a deposição das proteínas C3, e C5 a C9 nos sorovares não patogênicos Patoc e Andamana e nos patogênicos listados na **Tabela 1**. Não detectamos diferença na deposição de C3, igualmente depositado em todas as estirpes de leptospiras testadas. Foi encontrada diferença na deposiçãodas proteínas C5, C8 e C9 sendo maior para o sorovar Andamana quando comparado aos demais sorovares, não sendo encontrada diferença significativa da deposição quando consideradoso sorovar Patoc e os sorovares patogênicos. Na avaliação de deposição das proteínas C6 e C7 houve diferença significativa com maior deposição nas estirpes saprófitas quando comparadas às patogênicas. Uma explicação para esta aparente divergência de resultados pode ser a menor concentração de SHN (20%) utilizado na incubação das leptospiras em nossos experimentos, sendo que nos trabalhos acima citados, os autores utilizaram 40% de SHN.

No presente trabalho a diferença de deposição das proteínas do Complemento sobre as leptospiras foi avaliada qualitativamente por *Western blot.* Observamos a presença de bandas com peso molecular de aproximadamente, 110 kDa e 75 kDa (cadeias α e β de C3, respectivamente) e uma banda com peso molecular de aproximadamente 40 kDa indicando a parte da cadeia α' do fragmento iC3b, indicados na **Figura 11**. Pode-se inferir que o Sistema Complemento foi ativado,pois a proteína C3 e seus fragmentos depositaram na membrana das leptospiras não patogênicas. Mesmo em algumas das leptospiras patogênicas foi observada a deposição de iC3b. O iC3b é uma importante opsonina para fagocitose e demonstrada também em estirpes virulentas de *Streptococcus pneumoniae*. O receptor do Complemento CR3 quando interage com opsoninas (iC3b) pode mediar a interação de leptospiras com as células fagocíticas (Cinco et al., 1981; 2002). Por *Western blot* observamos também a deposição das proteínas C3, C6 e C7, em acordo com os resultados obtidos ELISA.

Empregando estudos de interação dos componentes da Via Terminal Comum do SC com *Salmonella minnesota* S218, Joiner et al. (1982) observaram resistência deste patógeno à deposição das proteínas C8 e C9, sendo considerado um mecanismo de escape para lise pelo MAC. Observamos fenômeno semelhante em nossos experimentos, sendo as espécies patogênicas pouco susceptíveis à deposição das proteínas que compõem a Via Terminal Comum, enquanto que as espécies *L. biflexa* sorovar Patoc e *L. biflexa* sorovar Andamana apresentaram maior interação.

As diferenças de resistência ou sensibilidade das leptospiras ao Sistema Complemento podem interferir no sucesso ou fracasso dainfecção do hospedeiro. Meri et al. (2005) mostraram que a resistência de leptospiras patogênicas à ação bactericida do SHN depende da aquisição do FH nas superfícies de leptospiras patogênicas. Nosso grupo também demonstrou que a aquisição de outros fatores de regulação de fase fluida por proteínas de superfície externas das leptospiras são benéficas para evasão e sobrevivência. Como por exemplo, a aquisição de C4BP, FH, FHR-1 e Vitronectina (Barbosa et al., 2009, 2010; Valencia-Castiblanco et al., 2012; da Silva et al., 2015). A proteína de membrana *Leptospiral endostatin-likeprotein A* (LenA) é capaz de interagir com a proteína reguladora FH (Verma et al., 2006), bem como as proteínas *leptospiral immunoglobulin-like* (Ligs) que interagem tanto com FH, FHR-1 quanto com C4BP (Choy et al., 2007; Matsunaga et al., 2003 e 2007; Palaniappan et al., 2004; Valência-Castiblanco et al., 2012). A proteína *leptospiral complement regulator-acquiring protein A* (LcpA) também interage com os reguladores C4BP, FH e Vitronectina (Barbosa et al., 2010, da Silva et al., 2015). Estas proteínas de membrana expressas durante uma infecção são importantes fatores de virulência que permitem a ineficácia das três vias do Complemento em espécies patogênicas e a morte das estirpes não patogênicas, já que estas não expressam esses reguladores de superfície.

A secreção de proteases por leptospiras patogênicas pode auxiliar na evasão, inibindo vias do Sistema Complemento, pois são capazes de clivar as proteínas C3, C3b, iC3b, C4b, FB, C2, C5 (Fraga et al., 2014), e também outras proteínas como C6, C7, C8 e C9 (Amamura et al., 2017). Porém estas pesquisas mostraram que a termolisina só é capaz de clivar as proteínas que compõem o MAC em forma purificada; o mesmo êxito não é visto em proteínas oriundas do soro, portanto há ainda uma dúvida do nosso grupo se a termolisina seria realmente capazde clivar tais proteínas que estão depositadas em sua membrana celular na presença de SHN.

Sendo assim, neste trabalho podemos sugerir que a Via das Lectinas, dependente de ficolinas 1, 2 e 3,poderia ser a mais relevante para a eliminação das leptospiras de espécie não patogênica. Já a Via Clássica mostrou-se minimamente eficaz na eliminação das bactérias não patogênicas, pois houve uma menor frequência de bactérias sobreviventes em relação à Via das Lectinas, porém, maior em relação à Via Alternativa. Por outro lado, a Via Alternativa é a menos importante, já que os sorovares de *L. biflexa* foram quase totalmente eliminados na ausência do FD e FB.

Por fim, nenhuma via do Sistema Complemento foi capaz de afetar as espécies patogênicas nas condições estudadas neste trabalho. Futuramente, avaliaremos mais profundamente quais mecanismos da Via das Lectinas são ativados para a eliminação das leptospiras não patogênicas, assim como as contribuições destes mecanismos na tentativa de eliminação dessas bactérias patogênicas durante o processo da infecção.

7 Conclusões

- Os sorovares Patoc e Andamana de *L. biflexa* são susceptíveis à ação bactericida do Sistema Complemento, quando incubadas com SHN, no entanto, são capazes de resistir ao tratamento com SHN+EDTA 10 mM, e em porcentagem menor, ao SHN+EGTA 10 mM.
- Leptospiras não patogênicas são mortas principalmente pela ativação da Via das Lectinas, e minimamente, pela Via Clássica. A Via Alternativa parece não ser importante para a eliminação de tais leptospiras.
- As espécies patogênicas mostraram-se resistentes ao SHN em todas as condições de tratamento, portanto, foram resistentes a todas as vias do Sistema Complemento.
- A proteína C3 é depositada em intensidade semelhante nas superfícies das leptospiras patogênicas e não patogênicas. No entanto, a ativação do componente C3 foi evidenciada, principalmente, na espécie de leptospiras não patogênicas, e em poucas espécies patogênicas.
- As proteínas C6 e C7 depositam-se em maior quantidade em ambos os sorovares saprófitas quando comparados com as espécies patogênicas. Foi observada diferença de deposição entre as estirpes de espécie saprófita apenas na proteína C7.
- Por sua vez, a *L. biflexa* sorovar Andamana estirpe CH11 deposita mais proteína C5 quando comparada com sorovares o sorovar Pyrogenes e Icterohaemorrhagiae, C8 quando comparada com sorovares Pyrogenes, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni e C9 quando comparadas com sorovares Kennewicki, Pomona, Panama, Pyrogenes e Icterohaemorrhagiae.
- A interação de proteínas do Complemento não é observada de maneira semelhante entre os dois sorovares não patogênicos, mesmo pertencendo à mesma espécie.

Referências*

Abbott C, West L, Povey S, Jeremiah S, Murad Z, DiScipio R, Fey G. The gene for human complement component C9 mapped to chromosome 5 by polymerase chain reaction. Genomics. 1988; 4 (4): 606-9.

Adler B, Moctezuma AP. *Leptospira* and leptospirosis. Veterinary Microbiology. 2010; 140: 287-96.

Adler B. *Leptospira* and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2015; 387: 2196-9965.

Agah A, Montalto MC, Kiesecker CL, Morrissey M, Grover M, Whoolery KL, Rother RP, Stahl GL. Isolation, characterization, and cloning of porcine complement component C7. J Immunol. 2000; 165(2): 1059-65.

Agampodi SB, Matthias MA, Moreno AC, Vinetz JM. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. Clin Infect Dis. 2012; 54: 1249–55.

Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. PLoS One 2009; 4:e7093.

Ahmed A, Grobusch MP, Klatser PR, Hartskeerl RA. Molecular approaches in the detection and characterization of Leptospira. J Bacteriol Parasitol. 2012; 3:1000133.

Aksamit RR, Falk W, Leonard EJ. Chemotaxis by mouse macrophage cell lines. J Immunol. 1981; 1950(126): 2194–9.

Aleshin AE, Schraufstatter IU, Stec B, Bankston LA, Liddington RC, DiScipio RG. Structure of complemente C6 suggests a mechanism for initiation and unidirectional, sequential assembly of membrane attack complex (MAC). J Biol Chem.2012;287(13):10210-22.

Amamura TA, Fraga TR, Vasconcellos SA, Barbosa AS, Isaac L. Pathogenic Leptospira Secreted Proteases Target the Membrane Attack Complex: A Potential Role for Thermolysin in Complement Inhibition. Front Microbiol. 2017; 8(958): 1-16

Appassakij H, Silpapojakul K, Wansit R, Woodtayakorn J. Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis. Am J Trop Med Hyg. 1995; 52: 340–3.

Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, Plikaytis BD, Perkins BA, Phelan M, Levett PN, Weyant RS. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol. 2003; 41: 803–9.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htlm

Bally I, Rossi V, Lunardi T, Thielens NM, Gaboriaud C, Arlaud GJ. Identification of the C1q-binding sites of human C1r and C1s: a refined three-dimensional model of the C1 complex of complement. J Biol Chem. 2009; 284:19340–8.

Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, Atzingen MV, Watanabe MM, Vieira ML, Morais ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. Infect Immun 2006; 74: 6356–64.

Barbosa AS, Abreu PAE, Vasconcellos SA, Morais ZM, Gonçales AP, Silva AS, Daha MR, Isaac L. Immune evasion of Leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP.Infection and Immunity. 2009; 77(3): 1137-43.

Barbosa AS, Monaris D, Silva LB, Morais ZM, Vasconcellos SA, Cianciarullo AM, Isaac L, Abreu PA. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of Leptospira spp. that binds the human complement regulator C4BP. Infect Immun. 2010; 78: 3207–16.

Baruah P, Dumitriu IE, Malik TH, Cook HT, Dyson J, Scott D, etal. C1q enhances IFN-gamma production by antigen-specific T cells via the CD40 costimulatory pathway on dendritic cells. Blood. 2009; 113: 3485–93.

Benge GR. Bactericidal activity of human serum against strains of *Klebsiella* from different sources. J Med Microbiol. 1988; 27(1): 11-5.

Berends ET, Dekkers JF, Nijland R, Kuipers A, Soppe JA, van Strijp JA, Rooijakkers SH. Distinct localization of the complement C5b-9 complex on Gram-positive bacteria. Cell Microbiol. 2013;12:1955-68.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infectious Diseases. 2003; 3: 757–71.

Borowski RS, Schiller NL. Examination of the bactericidal and opsonic activity of normal human serum for a mucoid and non-mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Current Microbiology. 1983; 9: 25–30.

BredaLCD, Vasconcellos SA, de Moraes Vasconcelos D, Isaac L. Binding of human complement C1 sterase inhibitor to *Leptospira* spp. Immunobiology. 2018; 223(2): 183-90.

Brier S, Pflieger D, Le Mignon M, Bally I, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Daniel R. Mapping surface accessibility of the C1r/C1s tetramer by chemical modification and mass spectrometry provides new insights into assembly of the human C1 complex. J Biol Chem. 2010; 285: 32251–63.

Bubeck D, Roversi P, Donev R, Morgan BP, Llorca O, Lea SM. Structure of human complement C8, a precursor to membrane attack. Journal of Molecular Biology. 2011; 405: 325–30.

Bubeck D. The making of a macromolecular machine: Assembly of the membrane attack complex. Biochemistry. 2014; 53: 1908-15.

Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: a re-emerging virus. Lancet. 2012; 379: 662–71.

Cameron CE. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. In Adler B. Leptospira and Leptospirosis. New York: Springer; 2015. 11-20.

Carney DF, Haviland DL, Noack D, Wetsel RA, Vik DP, Tack BF. Structural aspects of the human C5 gene. Intron/exon organization, 5'-flanking region features, and characterization of two truncated cDNA clones. J Biol Chem. 1991; 266(28): 18786-9.

Carroll MC. The complement system in B cell regulation. Molecular Imunnology. 2004; 41: 141-6.

Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by complement. Immunity. 2012; 37: 199-207.

Castiblanco-Valencia, MM; Fraga, TR; da Silva, LB; Monaris, D; Abreu, PAE; Strobel, S; Józsi, M; Isaac, L; Barbosa, AS. Leptospiral Immunoglobulin-like Proteins Interact With Human Complement Regulators Factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. The Journal of Infectious Diseases. 2012; 205: 995-1004.

Chandy S, Kirubanandhan L, Hemavathy P, Khadeeja AM, Kurian SJ, Venkataraman K, Mørch K, Mathai D, Manoharan A. Serovar prevalence of Leptospira in semirural India and the development of IgM-based indirect ELISA. J Infect Dev Ctries. 2017;11(3): 234-41.

Charon J, Toto PD, Gargiulo AW. Activated macrophages in human periodontitis. J Periodontol. 1981 Jun; 52(6):328-35.

Chassin C, Picardeau M, Goujon JM. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans. J. Immunol.* 2009183(4), 2669–77.

Chen CB, Wallis R. Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J BiolChem*. 2006; 279:26058–65.

Cherukuri A, Cheng PC, Pierce SK. The role of the CD19/CD21 complexin B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. J Immunol. 2001; 1950(167): 163–72.

Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of Leptospira interrogans adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. Infect Immun. 2007; 75: 2441–50.

Cinco M, Banfi E, Soranzo MR. Leptospires macrophage interactions. Adv Exp Med Biol 1982; 141: 167–74.

Cinco M, Banfi E, Soranzo MR. Studies on the interaction between macrophages and leptospires. J Gen Microbiol. 1981; 124: 409–13.

Cinco M, Cini B, Perticarari S, Presani G. Leptospira interrogans binds to the CR3 receptor on mammalian cells. Microb Pathog. 2002; 33: 299–305.

Cinco, M. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. New Microbiologica. 2010; 33: 283-92.

Cole DS, Morgan BP. Beyond Lysis: How Complement Influences Cell Fate. Clinical Science. 1979; 104: 455-66.

Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(9):e0003898.

Cumberland PC, Everard COR, Levett PN. Assessment of the efficacy of the IgM enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. Am J Trop Med Hyg. 1999; 61:731–4.

da Silva LB, Miragaia LS, Breda LCD, Abe CM, Schmidt MCB, Moro AM, Monaris D, Conde JN, Józsi M, Isaac L, Abreu PAE, Barbosa AS. Pathogenic Leptospira Species Acquire Factor H and Vitronectin via the Surface Protein LcpA. Infection and Immunity. 2015; 83(3): 888-97.

Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita F, Willis AC, Christensen T, Vorup-Jensen T, Jensenius JC. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity*. 2001;15:127–35.

Davies A, Simmons DL, Hale G, Harrison RA, Tighe H, Lachmann PJ, Waldmann H. CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. J Exp Med. 1989; 170: 637-54.

de Bruijn MH, Fey GH. Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. Proc Natl Acad Sci USA. 1985; 82(3):708-12.

Dias da Silva W, Lepow IH. Complement as a mediator of inflammation. II. Biological properties of anaphylatoxin prepared with purified components of human complement. J Exp Med. 1967; 125(5): 921-46.

DiScipio RG, Chakravarti DN, Muller-Eberhard HJ, Fey GH. The structure of human complement component C7 and the C5b-7 complex. J. Biol. Chem. 1988; 263: 549-60.

DiScipio RG, Gehring MR, Podack ER, Kan CC, Hugli TE, Fey GH. Nucleotide sequence of cDNA and derived amino acid sequence of human complement componente C9. Proc. Nat. Acad. Sci. 1984; 81: 7298-302.

DiScipio RG, Hugli TE. The architecture of complement component C9 and poly (C9). J. Biol. Chem.1985; 260(27): 14802-9.

DiScipio RG, Hugli TE. The molecular architecture of human complement component C6. J. Biol. Chem. 1989; 264(27): 16197-206.

Dobó J, Pál G, Cervenak L, Gál P. The emerging roles of mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) in the lectin pathway of complement and beyond. Immunol Rev.2016a;274(1):98-111.

Dobó J,SzakácsD, Oroszlán G,Kortvely E,Kiss B,Boros E,Szász R,Závodszky P, Gál P, Pál G.MASP-3 is the exclusive pro-factor D activator in resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked.Sci Rep. 2016b; 6: 1-12.

Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. Cell Research. 2010; 20: 34-50.

Dupuy AG, Caron E. Integrin-dependent phagocytosis: spreading from micro adhesion to new concepts. J Cell Sci. 2008; 121: 1773–83.

Eisenstein BI, Lee TJ, Sparling PF. Penicillin sensitivity and serum resistance are independent attributes of strains of *Neisseria gonorrhoeae* causing disseminated gonococcal infection. Infect. Immun. 1977; 15: 834-41.

el-Lati SG, Dahinden CA, Church MK. Complement peptides C3a-and C5a- induced mediator release from dissociated human skin mast cells. J Invest Dermatol. 1994; 102: 803-6.

Elsner J, Oppermann M, Czech W, Dobos G, Schöpf E, Norgauer J, Kapp A. C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. Eur J Immunol. 1994a; 24: 518–22.

ElsnerJ, Oppermann M, Czech W, Kapp A. C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin- sensitive G-proteins. Blood. 1994b; 83: 3324–31.

Evangelista KV; Coburn J. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. Future Microbiol. 2010; 5(9): 1413-25.

Everard JD, Everard COR. Leptospirosis in the Caribbean. Rev Med Microbiol. 1993; 4: 114-22.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. Leptospira and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne: MedSci; 1999.

Fang Y, Xu C, Fu Y-X, Holers VM, Molina H. Expression of complement receptors 1 and 2 on folicular dendritic cells is necessary for the generation of a Strong antigen-specific Ig G response. J Immunol. 1998; 160: 5273–9.

Farries TC, Seya T, Harrison RA, Atkinson JP. Competition for binding sites on C3b by CR1, CR2, MCP, factor B and factor H. Complement Inflamm. 1990; 7(1): 30-41.

Fischer WH, Hugli TE. Regulation of B cell functions by C3a and C3a (desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal imune response. J Immunol. 1997; 1950(159): 4279-86.

Fletcher CM, Harrison RA, Lachmann PJ, Neuhaus D. Structure of a soluble, glycosylated form of the human complement regulatory protein CD59. Structure. 1994; 1993(2):185–99.

Forbes, A. E.; Zochowski, W.J.; Dubrey, S.W.; Sivaprakasam, V. Leptospirosis and Weil's disease in the UK.QJ Med. 2012; 105: 1151-62.

Fraczek LA, Martin BK. Transcriptional Controlo of Genes for Soluble Complement Cascade Regulatory Proteins. Molecular Immunology. 2010; 48: 9-13.

Fraga, T.R.; Barbosa, A.S.; Isaac, L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. Scandinavian Journal of Immunology. 2011; 73: 408-19.

Fraga, T.R.; Courrol, D.S.; Castiblanco-Valencia, M.M.; Hirata, I.Y.; Vasconcellos, S.A.; Juliano, L.; Barbosa, A.S.; Isaac, L. Immune evasion by pathogenic Leptospira strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. The Journal of Infectious Diseases. 2014; 209: 876-86.

Frederiksen PD, Thiel S, Larsen CB, Jensenius JC. M-ficolin, an innate immune defence molecule, binds patterns of acetyl groups and activates complement. Scand J Immunol. 2005; 62: 462–73.

Fujita T, Kamato T, Tamura N. Characterization of Functional Properties of C4- Binding Protein by Monoclonal Antibodies. Journal of Immunology. 1985; 134: 3320-4.

Gaboriaud C, Thielens NM, Gregory LA, Rossi V, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. Trends Immunol. 2004; 25(7): 368-73.

Gál P, Harmat V, Kocsis A, Bián T, Barna L, Ambrus G, Végh B, Balczer J, Sim RB, Náray-Szabó G, Závodszky P. A true auto-activating enzyme. Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activations. J Biol Chem. 2005; 280: 33435–44.

Gregory LA, Thielens NM, Arlaud GJ, Fontecilla-Camps JC, Gaboriaud C. X-ray structure of the Ca2+-binding interaction domain of C1s. Insights into the assembly of the C1 complex of complement. J Biol Chem. 2003; 278: 32157–64.

Guerra AM. Leptospirosis. J Am Vet Med Assoc. 2009; 234: 472-8.

Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in Humans. In Adler B. Leptospira and Leptospirosis. New York: Springer. 2015; 1: 11-20.

Hadders MA, Beringer DX, Gros P. Structure of C8a-MACPF Reveals Mechanism of Membrane Attack in Complement Immune Defense. Science 2007; 317(5844): 1552-54.

Harboe M, Mollnes TE. The alternative complement pathway revisited. J Cell Mol Med. 2008; 12(4): 1074–84.

Haviland DL, Haviland JC, Fleischer DT, Hunt A, Wetsel RA. Complete cDNA sequence of human complement pro-C5. Evidence of truncated transcripts derived from a single copy gene. J Immunol. 1991; 146(1): 362-8.

Heath CW, Alexander AD, Galton MM. Leptospirosis in the United States: Analysis of 483 Cases in Man, 1949–1961. Nem England Journal of Medicine. 1965; 273: 857-922.

Hobart MJ, Cook PJ, Lachmann PJ. Linkage studies with C6. J Immunogenet. 1977; 4(6): 423-28.

Hobart MJ, Fernie B, DiScipio RG. Structure of the human C6 gene. Biochemistry. 1993; 32(24): 6198-205.

Honore, C., Rorvig, S., Munthe-Fog, L., Hummelshoj, T., Madsen, H.O., Borregaard, N., Garred, P. The innate pattern recognition molecule ficolin-1 is secreted by monocytes/macrophages and is circulating in human plasma. Mol. Immunol. 2008; 45, 2782-9.

Hospenthal DR, Murray CK. In vitro susceptibilities of seven Leptospira species to traditional and newer antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47: 2646–8.

Hummelshoj, T., Munthe-Fog, L., Madsen, H.O., Fujita, T., Matsushita, M., Garred, P. Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of ficolin-2. Hum. Mol. Genet. 2005; 14, 1651–8.

Isenman DE, Kells DI, Cooper NR, Müller-Eberhard HJ, Pangburn MK. Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional properties. Biochemistry. 1981; 20: 4458–67.

Isogai E, Isogai H, Fujii N, Oguma K. Biological effects of leptospiral lipopolysaccharide to mouse B, T and NK cells. Nihon Juigaku Zasshi. 1990; 52(5):923-30.

Janssen BJC, Huizinga EG, Raaijmakers HCA, Roos A, Daha MR, Nilsson-Ekdahl K, Nilsson B, Gross P. Structures of component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. Nature. 2005; 437(22): 505-11.

Johnson DE, Calia FM, Musher DM, Goree A. Resistance of *Vibrio vulnificus* to serum bactericidal and opsonizing factors: relation to virulence in suckling mice and humans. J Infect Dis. 1984; 150(3): 413-8.

Johnson RC, Harris VG. Antileptospiral Activity of Serum – II. Leptospiral Virulence Factor. Journal of Bacteriology. 1967a; 93(2): 513-9.

Johnson RC, Harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. J Bacteriol. 1967b; 94: 27–31.

Johnson RC, Muschel LH. Antileptospiral activity of normal serum. J Bacteriol. 1965; 89:1625-6.

Joiner K ,Brown E, Hammer C, Warren K, Frank M. J Immunol. 1983; 130: 845–9.

Joiner KA, Hammer CH, Brown EJ, Frank MM. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. II. C8 and C9 release C5b67 from the surface of *Salmonella minnesota* S218 because the terminal complex does not insert into the bacterial outer membrane. J Exp Med. 1982; 155(3): 809-19.

Kemper C, Hourcade DE. Properdin: New roles in pattern recognition and target clearance. Mol Immunol. 2008; 45(16): 4048-56.

Kishore U, Ghai R, Greenhough TJ, Shrive AK, Bonifati DM, Gadjeva MG, Waters P, Kojouharova MS, Chakraborty T, Agrawal A. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. Immunol Lett. 2004; 95: 113–28.

Kjaer TR, Thiel S, Andersen GR. Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. Mol Immunol. 2013; 56: 413–22

Klos A, Tenner AJ, Johswich K-O, Ager RR, Reis ES, Köhl J. The role of the ana-phylatoxins in health and disease. Mol Immunol. 2009; 46: 2753–66.

Klos A, Wende E, Wareham KJ, Monk PN. International union of basic and clinical pharmacology. [corrected]. LXXXVII.Complement peptide C5a, C4a, and C3a receptors. Pharmacol Ver. 2013; 65: 500–43.

Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nat Rev Microbiol. 2009; 7(10):736-47.

Kohler PF, Müller-Eberhard HJ. Immunochemical quantitation of the third, fourth and fifth components of human complement: concentrations in the serum of healthy adults. J Immunol. 1967; 99(6):1211-6.

Kolev M, Le Friec G, Kemper C. Complement--tapping into new sites and effector systems. Nat Rev Immunol. 2014; 14(12): 811-20.

Koski CL, Ramm LE, Hammer CH, Mayer MM, Shin ML. Cytolysis of nucleated cells by complement: cell death displays multi-hit characteristics. Proc Natl Acad Sci USA. 1983; 80: 3816–20.

Krarup A, Thiel S, Hansen A, Fujita T, Jensenius JC. L-ficolin is a pattern rec-ognition molecule specific for acetyl groups. J Biol Chem. 2004; 279: 47513–9.

Krarup A, SorensenUBS, Matsushita M, Jensenius JC, Thiel S. Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin L-ficolin, and H-ficolin. Infect. Immun. 2005; 73:1052–60.

Kretzschmar T, Jeromin A, Gietz C, Bautsch W, Klos A, Köhl J, Rechkemmer G, Bitter-Suermann D. Chronic myelogenous leukemia-derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a. Eur J Immunol. 1993; 23: 558–61.

Lappin DF, Whaley K. Interfero-induced Transcriptional and Post-transcriptional Modulation of Factor H and C4 Binding-Protein Synthesis in Human Monocytes. Biochemistry Journal. 1990; 271: 767 – 72.

Lett-Brown MA, Leonard EJ. Histamine-induced inhibition of normal human basophil chemotaxisto C5a. J Immunol. 1977; 1950(118): 815–8.

Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 296–326.

Levett PN. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? Clin Appl Immunol. 2004; Rev 4:435–48.

Levett PN. Systematics of leptospiraceae. In Adler B. Leptospira and Leptospirosis. New York: Springer. 2015; 1: 11-20.

Lim, V.K.E. Leptospirosis: a re-emerging infection. Malaysian J Pathol. 2011;33(1): 1-5.

Lovelace LL, Cooper CL, Sodetz JM, Lebioda L. Structure of human C8 protein provides mechanistic insight into membrane pore formation by complement. J Biol Chem. 2011; 286(20): 17585-92.

Lu JH, Thiel S, Wiedemann H, Timpl R, Reid KB. Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zimosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. *J Immunol*. 1990;144: 2287–94.

Lutz HU, Jelezarova E. Complement amplification revisited. Mol. Immunol. 2006; 43: 2–12.
Malmström J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebersold R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen Leptospira interrogans. Nature. 2009; 460: 762–5.

Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F, Ricklin-Lichtsteiner SK, Koutoulaki A, Gerard C, Coukos G, Lambris JD. Modulation of the antitumor immune response by complement. Nat Immunol. 2008; 9(11): 1225-35.

Martini, E. Z.; Prado, R. P. Leptospirosis. Puesta al dia Rev Chil. Infect. 2007; 24(3): 220-6.

Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, Bolin CA, Reis MG, Riley LW, Haake DA, Ko AI. Pathogenic Leptospira species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. Mol Microbiol. 2003; 49: 929–45.

Matsunaga J, Lo M, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B, Haake DA. Response of Leptospira interrogans to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. Infect Immun. 2007; 75: 2864–74.

Matsushita M, Endo Y, Fujita T. Structural and functional overview of the lectin complement pathway: its molecular basis and physiological implication. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2013; 61: 273–83.

Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. J Exp Med. 1992; 176(6):1497-502.

Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Terai I, Fujita T. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol*. 2000; 165:2637–42.

Mayadas TN, Cullere X. Neutrophil beta 2 integrins: moderators of life or death decisions. Trends Immunol. 2005; 26: 388–95.

McCabe, W. R., B. Kaijser, S. Olling, M. Uwaydah, and L. A. Hanson. *Escherichia coli* in bacteremia: K and 0 antigens and serum sensitivity of strains from adults and neonates. J. Infect. Dis. 1978; 138: 33-41.

Meri S, Jarva H. Complement Regulation. Vox Sanguinis. 1998; 74: 291-302.

Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniels RH, Olavesen MG, Waldmann H, Lachmann PJ. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. Immunology. 1990; 71(1): 1–9.

Meri T, Cutler SJ, Blom AM, Meri S, Jokiranta TS. Relapsing fever spirochetes *Borrelia recurrentis* and *B. duttonii* acquire complement regulators C4b-binding protein and factor H. Infect. Immun. 2006; 74: 4157–63.

MeriT,Murgia R,Stefanel P,MeriS,CincoM.Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. Microb Pathog. 2005; 39(4):139-47.

Merien, F., J. Truccolo, G. Baranton, and P. Perolat. Identification of a 36 kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of Leptospira interrogans serovar Icterohaemorrhagiae. FEMS Microbiol. Lett. 2000; 185: 17–22.

Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. Front Immunol. 2015a; 6(262): 1-26.

Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT.Complement System Part II: Role in Immunity.Front Immunol. 2015b; 6(257): 1-25.

Minta JO, Fung M, Turner S, Eren R, Zemach L, Rits M, Goldberger G. Cloning and characterization of the promoter for the human complement factor I (C3b/C4b inactivator) gene. Gene. 1998; 208(1): 17-24.

Miwa T, Song WC. Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases. International Immunopharmacology. 2001; 1(3): 445-59.

Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. Biochem J. 1989; 264: 1–14.

Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM, Bruce M, Bolin CA, Austin CC, Woods CW, Lingappa J, Langkop C, Davis B, Graham DR, Proctor M, Ashford DA, Bajani M, Bragg SL, Shutt K, Perkins BA, Tappero JW Outbreak of leptospirosis among triathlon participants andcommunity residents in Springfield, Illinois, 1998. Clin Infect Dis. 2002; 34:1593–9.

Morley BJ, Walport MJ. The Complement Factsbook. London: Academic Press. 2000; 204p.

Muller-Eberhard HJ. Molecular Organization and Function of the Complement System. Ann. Rev. Biochem. 1988; 57: 321-47.

Muller-Eberhard HJ. The killer molecule of complement. J. Invest. Dermatol. 1985; 85: 47–52.

Munthe-Fog, L., Hummelshoj, T., Hansen, B.E., Koch, C., Madsen, H.O., Skjodt, K., Garred, P. The impact of FCN2 polymorphisms and haplotypes on the ficolin-2 serum levels. Scand. J. Immunol. 2007; 65, 383–92.

Munthe-Fog, L., Hummelshoj, T., Ma, Y.J., Hansen, B.E., Koch, C., Madsen, H.O., Skjodt, K., Garred, P. Characterization of a polymorphism in the coding sequence of FCN3 resulting in a ficolin-3 (Hakata antigen) deficiency state. Mol. Immunol. 2008; 45, 2660–6.

Murakami Y, Imamichi T, Nagasawa S. Characterization of C3 a anaphylatoxin receptor on guinea-pig macrophages. Immunology. 1993; 79: 633–8.

Nahori MA, Fournie-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M, Raetz CR, Saint Girons I, Werts C. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. J Immunol. 2005; 175: 6022–31.

Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. The Complement System: History, Pathways, Cascade and Inhibitors. European Journal of Microbiology and Immunology 2. 2012; 2: 103-11.

Nishida N, Walz T, Springer TA. Structural transitions of complement component C3 and its activation products. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103:19737–42.

Ooi YM, Colten HR. Biosynthesis and post-synthetic modification of a precursor (pro-C5) of the fifth component of mouse complement (C5). J Immunol. 1979; 123(6): 2494-8.

Orren A, Owen EP, Henderson HE, van der Merwe L, Leisegang F, Stassen C, Potter PC. Complete deficiency of the sixth complement component (C6Q0), susceptibility to Neisseria meningitidis infections and analysis of the frequencies of C6Q0 gene defects in South Africans. Clinical and Experimental Immunology. 2011; 167: 459–71.

Palaniappan RU, Chang YF, Hassan F, McDonough SP, Pough M, Barr SC, Simpson KW, Mohammed HO, Shin S, McDonough P, Zuerner RL, Qu J, Roe B. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by Leptospira interrogans and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. J Med Microbiol. 2004; 53: 975–84.

Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Vibhagool A, Thinkamrop B, Susaengrat W. Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis. Clin Infect Dis. 2003; 36: 1507–13.

Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. J Exp Med. 1981; 154: 856–67.

Pereira de Carvalho Florido M, Ferreira de Paula P, Isaac L. Simple method to distinguish between primary and secondary C3 deficiencies. Clin Diagn Lab Immunol. 2003; 10(2): 216-20.

Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014; 78(1):1-8.

Picardeau M, Brenot A, Saint Girons I. First evidence for gene replacement in Leptospira spp. Inactivation of L. biflexa *fla*B results in non-motile mutants deficient in endoflagella. Mol Microbiol. 2001; 40(1): 189-99.

Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Med Mal Infect. 2013; 43(1):1-9.

Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? Nat Rev Microbiol. 2017;15(5):297-307.

Preissner KT, Podack ER, Müller-Eberhard HJ. The membrane attack complex of complement: relation of C7 to the metastable membrane binding site of the intermediate complex C5b-7. J Immunol. 1985;1950(135):445–51.

Reis ES, Falcão DA, Isaac L. Clinical aspects and molecular basis of primary deficiencies of complement component C3 and its regulatory proteins factor I and factor H. Scand J Immunol. 2006; 63: 155–68.

Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RD, Santana FS, Mohr S, Melendez AX, Queiroz A, Santos AC, Ravines RR, Tassinari WS, Carvalho MS, Reis MG, Ko AI. Impact of environment and social gradient on Leptospira infection in urban slums. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2008; 2: e228.

Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG, Zhao GP. Unique physiological and pathogenic features of Leptospira interrogans revealed by whole-genome sequencing. Nature. 2003; 422: 888–93.

Ressner RA, Griffith ME, Beckius ML, Pimentel G, Miller RS, Mende K, Fraser SL, Galloway RL, Hospenthal DR, Murray CK. Antimicrobial susceptibilities of geographically diverse clinical human isolates of Leptospira. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52: 2750–4.

Ribeiro MA, Assis CSN, Romero EC. Serodiagnosis of human leptospirosis employing immunodominant antigen. Serodiagn Immunother Infect Dis. 1994; 6: 140–4.

Ricklin D; Hajishengallis G; Yang K; Lambris JD. Complement– A Key System for Immune Surveillance and Homeostasis. Nature Immunology. 2010;11: 785-97.

Rorvig, S., Honore, C., Larsson, L.I., Ohlsson, S., Pedersen, C.C., Jacobsen, L.C., Cowland, J.B., Garred, P., Borregaard, N. Ficolin-1 is present in a highly mobilizable subset of human neutrophil granules and associates with the cell surface after stimulation with fMLP. J. Leukocyte Biol. 2009; 86, 1439–49.

Roumenina LT, Kantardjiev AA, Atanasov BP, Waters P, Gadjeva M, Reid KB, Mantovani A, Kishore U, Kojouharova MS. Role of Ca2+ in the electrostatic stability and the functional activity of the globular domain of human C1q. Biochemistry. 2005; 44:14097–109.

Rowley D, Wardlaw AC. Lysis of Gram-Negative Bacteria by Serum. J. gen. Microbiol.1958; 18: 529-33.

Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. Immunol Rev. 2001;180: 35-48.

Schoolnik GK, Buchanan TM, Holmes KK. Gonococci causing disseminated infection are resistant to the bactericidal action of normal human serum. J. Clin. Invest. 1976; 58: 1163-73.

Schreck SF, Parker C, Plumb ME, Sodetz JM. Human complement protein C8 gamma. Biochim Biophys Acta. 2000; 1482(1-2):199-208.

Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, Silva H, Cespedes MJ, Matthias MA, Swancutt MA, Lopez Linan R, Gotuzzo E, Guerra H, Gilman RH, Vinetz JM. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. Clin Infect Dis. 2005; 40: 343–51.

Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K, Bettinger J, Bajani M, Bragg S, Shutt K, Kaiser R, Marano N, Popovic T, Tappero J, Ashford D, Mascola L, Vugia D, Perkins B, Self CA, Iskrzynska WI, Waitkins SA, Whicher JW, Whicher JT Leptospirosis among British cavers. Cave Sci. 1987; 14: 131–4.

Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K, Bettinger J, Bajani M, Bragg S, Shutt K, Kaiser R, Marano N, Popovic T, Tappero J, Ashford D, Mascola L, Vugia D, Perkins B, Rosenstein N; Eco-Challenge Investigation Team. Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. Emerg Infect Dis. 2003; 9(6):702-7.

Simberkoff MS, Ricupero I, Rahal JJ Jr. Host resistance to *Serratia marcescens* infection: serum bactericidal activity and phagocytosis by normal blood leukocytes. J Lab Clin Med. 1976; 87(2): 206-17.

Singh B, Su YC, Riesbeck K. Vitronectin in bacterial pathogenesis: a host protein used in complement escape and cellular invasion. Mol Microbiol. 2010; 78: 545–60.

Siqueira GH, Atzingen MV, de Souza GO, Vasconcellos SA, Nascimento AL. *Leptospira interrogans* Lsa23 protein recruits plasminogen, factor H and C4BP from normal human serum and mediates C3b and C4b degradation. Microbiology. 2016; 162: 295-308.

Slack A, Symonds M, Dohnt M, Harris C, Brookes D, Smythe L. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic Leptospira spp. Against culture and Leptospira-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;57(2):361–6.

Slade DJ, Chiswell B, Sodetz JM. Functional studies of the MACPF domain of human complement protein C8alpha reveal sites for simultaneous binding of C8beta, C8gamma, and C9. Biochemistry. 2006; 45(16): 5290-6.

Slade DJ, Lovelace LL, Chruszcz M, Minor W, Lebioda L, Sodetz JM. Crystal structure of the MACPF domain of human complement protein C8 alpha in complex with the C8 gamma subunit. J Mol Biol. 2008; 379(2): 331-42.

Smythe L, Dohnt M, Norris M, Symonds M, Scott J. Review of leptospirosis notifications in Queensland 1985 to 1996. Commun Dis Intell. 1997; 21(2): 17-20.

Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for assembly. J. Immunol. 2007; 179: 2600–8.

Steneroden KK, Hill AE, Salman MD. Zoonotic disease awareness in animal shelter workers and volunteers and the effect of training. Zoonoses Public Health. 2011; 58(7):449-53.

Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Miller MC, Demoll E, Kraiczy P, Cooley AE, Creamer TP, Suchard MA, Brissette CA, Verma A, Haake DA. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. PLoS One. 2007; 2(11): e1188.

Strainic MG, Liu J, Huang D, Na F, Lalli PN, Muqim N, Shapiro, VS, Dubyak GR, Heeger OS, Medof ME. Locally produced complemente fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. Immunity. 2008; 28: 425–35.

Tegla CA, Cudrici C, Patel S, Trippe R, Rus V, Niculescu F, Rus H. Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. Immunol Res. 2011; 51(1): 45-60.

Thaipadungpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Boonslip S, et al. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting *16S rRNA* and *lipL32* genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. PLoS One 2011;6:e16236.

Thomas AD, Orren A, Connaughton J, Feighery C, Morgan BP, Roberts AG. Characterization of a large genomic deletion in four Irish families with C7 deficiency. Mol Immunol. 2012; 50(1-2): 57-9.

Tubiana S, Mikulski M, Becam J, Lacassin F, Lefevre P, Gourinat AC, Goarant C, D'Ortenzio E. Risk factors and predictors of severe leptospirosis in New Caledonia. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7:e1991.

Uotila LM, Aatonen M, Gahmberg CG. Integrin CD11c/CD18 α-chain phos- phorylation is functionally important. J Biol Chem. 2013; 288: 33494–9.

Verma AL, Hellwage J, Artiushin S, Zipfel PF, Kraiczy P, Timoney JF, Stevenson B. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. Infect Immun. 2006; 74: 2659–66.

Vieira ML, Atzingen MV, Oliveira R, Mendes RS, Domingos RF, Vasconcellos SA, Nascimento AL. Plasminogen binding proteins and plasmin generation on the surface of *Leptospira* spp.: the contribution to the bacteria-host interactions. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:1-17.

Vieira ML, de Morais ZM, Vasconcellos SA, Romero EC, Nascimento AL. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic Leptospira interrogans. Microb. Pathog. 2011; 51: 360–5.

Vieira ML, Vasconcellos SA, Gonçales AP, Morais ZM, Nascimento AL. Plasminogen acquisition and activation at the surface of leptospira species lead to fibronectin degradation. Infection and Immunity. 2009; 77(9): 4092–101.

Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Krogfelt KA. Novel TaqMan® PCR for detection of Leptospira species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation. J Microbiol Methods 2012;91: 184–90.

Vinci G, Lynch NJ, Duponchel C, Lebastard TM, Milon G, Stover C, Schwaeble W, Tosi M. In vivo biosynthesis of endogenous and of human C1 inhibitor in transgenic mice: tissue distribution and colocalization of their expression. J Immunol. 2002; 169(10): 5948-54.

Vosti KL, Randall E. Sensitivity of serologically classified strains of Escherichia coli of human origin to the serum bactericidal system. Am. J. Med. Sci. 1970; 259:114-9.

Waitkins S. Leptospirosis in man, British Isles: 1984. Brit Med J. 1986; 292: 1324.

Wallis R, Mitchell DA, Schmid R, Schwaeble WJ, Keeble AH. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. Immunobiology. 2010; 215(1): 1-11.

Walport MJ. Complement – Fist of two parts. N. England J. Med. 2001; 334(14):1058-66.

Wang X, Fleischer DT, Whitehead WT, Haviland DL, Rosenfeld SI, Leddy JP, Snyderman R, Wetsel RA. Inherited human complement C5 deficiency. Nonsense mutations in exons 1 (Gln1 to Stop) and 36 (Arg1458 to Stop) and compound heterozygosity in three African-American families. J Immunol. 1995; 154(10): 5464-71.

Wasinski B, Dutkiewicz J. Leptospirosis – current risk factors connected with human activity and the environment. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 2013; 20(12): 239-44.

Weil A. Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende, acute Infections krankheit. Dtsch Arch Klin Med. 1886; 39:209.

Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang T-H, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake D, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill D, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ. Leptospiral endotoxin activates cells via a TLR2-dependent mechanism. Nat Immunol. 2001; 2: 346–52.

Wilkins E, Cope A, Waitkins S. Rapids, rafts, and rats. Lancet. 1988; 2: 283–4.

Winslow WE, Merry DJ, Pirc ML, Devine PL. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. J Clin Microbiol. 1997; 35: 1938–42.

Winters MS, Spellman DS, Lambris JD. Solvent accessibility of native and hydro-lyzed human complement protein 3 analyzed by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. J Immunol. 2005; 1950(174): 3469–74.

Wolff DG, Castiblanco-Valencia MM, Abe CM, Monaris D, Morais ZM, Souza GO, Vasconcellos AS, Isaac L, Abreu PA, Barbosa AS. Interaction of leptospira elongation factor Tu with plasminogen and complement factor H: a metabolic leptospiral protein with moonlighting activities. PLoS One. 2013; 8(11): 1-10.

Würzner R, Orren A, Potter P, Morgan BP, Ponard D, Späth P, Brai M, Schulze M, Happe L, Götze O. Functionally active complement proteins C6 and C7 detected in C6- and C7-deficient individuals. Clin Exp Immunol. 1991; 83(3): 430-7.

Yongqing T, Drentin N, Duncan RC, Wijeyewickrema LC, Pike RN. Mannose- binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: two genes, five proteins and many functions? Biochim Biophys Acta. 2012;1824: 253–62.

Zipfel PF, Hallström T, Riesbeck K. Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes – Tipping the balance. Molecular Immunology. 2013; 56: 152-60.

Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. Nature Reviws. 2009;9: 729-40.

Zuerner RL. Laboratory maintenance of pathogenic leptospira. Curr Protoc Microbiol. 2005; Chapter 12:Unit 12E.1.