DENISE HARUMI SILVA YAMASHITA

**PARTICIPAÇÃO DO COMPONENTE C3
DO SISTEMA COMPLEMENTO MURINO
NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS
E FAGOCITOSE CONTRA *Leptospira interrogans***

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

RESUMO

Yamashita DHS. Participação do componente central C3 do Sistema Complemento murino na produção de anticorpos específicos e fagocitose contra *Leptospira interrogans*. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

A leptospirose é uma doença infecciosa importante mundialmente com mais de um milhão de casos estimados a cada ano. Estudos acerca dos mecanismos imunológicos envolvendo infecções por bactérias leptospiras, seu comportamento e sua capacidade de sobrevivência no hospedeiro, são de grande importância para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes. Neste tipo de infecção, a resposta imune inata e imune adaptativa (mediada por Complemento, fagocitose e anticorpos) são essenciais para o seu controle.

O Sistema Complemento é importante para a eliminação de leptospiras, entretanto ainda não se sabe se a morte destas bactérias depende mais da fagocitose ou da formação do complexo de ataque à membrana. No presente estudo, foram empregados camundongos C57BL/6 selvagens (B6.C3^{+/+}) e deficientes da proteína C3 (B6.C3^{-/-}) do Sistema Complemento.

Inicialmente investigamos *in vivo* a produção de anticorpos anti-leptospiras durante a infecção do animal. Os camundongos de ambas as linhagens foram imunizados com a *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (espécie patogênica) e com a proteína *leptospiral immunoglobulin-like* (LigBC), presente somente em espécies patogênicas. Nossos resultados mostraram que os camundongos B6.C3^{-/-} apresentaram menos anticorpos específicos contra as leptospiras, bem como para a proteína LigBC, em comparação com os camundongos B6.C3^{+/+}, igualmente imunizados. É importante destacar que a produção de anticorpos e proliferação de linfócitos B envolve a participação do complemento via CR2 e que pode ser modulada por fragmentos C3d(g), reconhecidos como importantes adjuvantes na imunidade humoral.

Nós avaliamos também o processo de fagocitose utilizando macrófagos peritoneais derivados de camundongos B6.C3^{+/+} e B6.C3^{-/-}. Observamos que *L. interrogans* mostrou-se resistente à internalização por macrófagos peritoneais de ambas as linhagens de camundongos, entretanto quando estas leptospiras foram previamente tratadas com soro de B6.C3^{+/+}, como fonte geradora de opsoninas C3b e iC3b, o número de leptospiras aumentou significativamente. Macrófagos derivados de camundongos B6.C3^{-/-} fagocitaram menos leptospiras, quando comparados com os macrófagos de B6.C3^{+/+}. Esta observação não pôde ser estendida para outras partículas, uma vez que não detectamos diferenças na ingestão de Zimosan por macrófagos de ambas as linhagens. A capacidade microbicida dependente da produção de NO não foi afetada pela ausência de C3. Também observamos que na ausência de C3, estas células fagocitárias secretam níveis reduzidos de citocinas TNF- α , IL-10, IL12p70 e MCP-1. Por outro lado, a citocina IL-6 foi secretada em maior concentração por macrófagos deficientes de C3, quando comparados com os macrófagos de camundongos C3^{+/+}.

Em apoio a estas conclusões, nossos resultados demonstram que o C3 é importante na defesa do hospedeiro, contribuindo para a melhor compreensão do papel do C3 do Sistema Complemento para controlar esta infecção.

Palavras-chave: Leptospira. C3. Sistema Complemento. Anticorpos. Fagocitose.

ABSTRACT

Yamashita DHS. Participation of the central component C3 of the Complement System murine in the production of specific antibodies and phagocytosis against *Leptospira interrogans*. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Leptospirosis is an important infectious disease worldwide with more than one million cases estimated each year. Studies on the immunological mechanisms involving infections by leptospires bacteria, their behavior and their survival capacity in the host, are of great importance for the development of more effective treatments. In this type of infection, the innate immune and adaptive immune response (Complement mediated, phagocytosis and antibodies) are essential for its control.

The Complement System is important for the elimination of leptospires, however it is not yet known if the death of these bacteria depends more on phagocytosis or the formation of the membrane attack complex. In the present study, C57BL/6 wild (B6.C3^{+/+}) and C3 protein deficient (B6.C3^{-/-}) mice from the Complement System were used.

We first investigated the production of anti-leptospire antibodies *in vivo* during the infection of the animal. Mice from both strains were immunized with the *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki Pomona Fromm strain (pathogenic species) and the leptospiral immunoglobulin-like protein (LigBC), present only in pathogenic species. Our results showed that B6.C3^{-/-} mice had fewer specific antibodies against leptospires as well as for LigBC protein compared to equally immunized B6.C3^{+/+} mice. It is important to highlight that the production of antibodies and proliferation of B lymphocytes involves the participation of the complement via CR2 and that can be modulated by fragments C3d(g), recognized as important adjuvants in humoral immunity.

We also evaluated the phagocytosis process using peritoneal macrophages derived from B6.C3^{+/+} and B6.C3^{-/-} mice. We observed that *L. interrogans* was resistant to the internalization by peritoneal macrophages of both strains of mice, however when these leptospires were previously treated with serum of B6.C3^{+/+}, as the source of opsonin C3b and iC3b, the number of internalized leptospires significantly increased. Macrophages derived from B6.C3^{-/-} mice phagocytosed less leptospires when compared to B6.C3^{+/+} macrophages. This observation could not be extended to other particles, since we did not detect differences in the ingestion of Zimosan by macrophages of both strains. The microbicidal capacity dependent on NO production was not affected by the absence of C3. We also observed that in the absence of C3, these phagocytic cells secrete reduced levels of cytokines TNF- α , IL-10, IL12p70 and MCP-1. On the other hand, the IL-6 cytokine was secreted in higher concentration by C3-deficient macrophages compared to the macrophages of C3^{+/+} mice.

In support of these findings, our results demonstrate that C3 is important in host defense, contributing to a better understanding of the role of Complement C3 in controlling this infection.

Keywords: Leptospira. C3. Complement System. Antibody. Phagocytosis.

Introdução

1.1 Leptospirose

A leptospirose é uma doença infecciosa de origem bacteriana causada por diferentes espécies de bactérias do gênero *Leptospira* spp. (Levett, 2001). Uma estimativa recente revelou que a carga global da leptospirose é um milhão de casos a cada ano com cerca de 60 mil mortes (Costa et al., 2015).

Os primeiros isolados de leptospirosas foram descritos há aproximadamente 100 anos por pesquisadores japoneses, a partir de experimentos utilizando-se cobaias como o primeiro modelo animal de infecção aguda. Os animais foram então infectados com sangue de pacientes com leptospirose e desenvolveram sintomas similares àqueles observados nos doentes, tais como albuminúria, congestão conjuntival, icterícia e hemorragia, critérios utilizados para a definição do quadro da doença. As leptospirosas foram encontradas no fígado e nos rins e, baseando-se em suas características morfológicas, foram nomeadas como *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (Inada et al., 1916).

Antecedendo a descoberta, em meados de 1886 o médico patologista Adolf Weil observou um tipo particular de icterícia, acompanhada de esplenomegalia, disfunção renal, conjuntivite e erupções cutâneas em seus pacientes, o que foi comprovado anos mais tarde com o isolamento dessa bactéria, e assim, a doença em sua forma mais grave foi reconhecida como Síndrome de Weil (Weil, 1886).

Espécies patogênicas de leptospirosas têm sido isoladas em uma ampla variedade de animais, como, por exemplo, cães, gatos, cavalos, búfalos, gados, porcos, gambás, morcegos, ovelhas e cervos (Adler, 2015). Além disso, as leptospirosas também têm sido recuperadas de animais como crocodilos, focas e leões-marinhos (Colagross-Schouten et al., 2002; Pérez-Flores et al., 2017).

Embora muitos animais sejam apontados como fonte de leptospirosas, os roedores são considerados os principais hospedeiros de manutenção da doença e também o principal transmissor para esta infecção em humanos, especialmente os ratos em centros urbanos (Bharti et al., 2003; Haake, Levett, 2015). Nos animais infectados, as leptospirosas podem colonizar túbulos renais que servem como reservatório destas bactérias que são liberadas na urina, podendo sobreviver por horas ou dias no ambiente contaminado. Por esta razão, as leptospirosas estão amplamente difundidas na natureza (Haake, Levett, 2015) (**Figura 1**).

Figura 1 - Ciclo de transmissão da leptospirose.

O ciclo de transmissão da leptospirose inicia-se principalmente quando os animais contaminados liberam as espiroquetas pela urina, contaminando o solo e a água. Os roedores são considerados os principais reservatórios da infecção humana. Os seres humanos podem se infectar de diferentes maneiras através de enchentes, esportes aquáticos, trabalho em fazendas e abatedouros, fatores de risco que se destacam no ciclo de transmissão. Os sintomas característicos da doença em estágios mais graves estão relacionados com a apresentação clínica: hemorragia pulmonar, disfunção renal e hepática (Fraga et al., 2014).

A leptospirose é considerada uma doença de grande impacto social, pois costuma afetar populações mais pobres que vivem em regiões com carência de saneamento básico e habitação adequada. Esses aspectos são os principais fatores de risco epidemiológico, uma vez que estes indivíduos estão mais expostos ao lixo a céu aberto e aos ratos atraídos a esses locais em busca de alimentos (Hagan et al., 2016). Em situações de enchentes, devido à falta de infraestrutura, a água contaminada pela urina dos roedores pode misturar-se com a água das chuvas, tornando os animais e os seres humanos mais vulneráveis à infecção por leptospiras (Ko et al., 1999; Ko et al., 2009).

Os seres humanos são considerados hospedeiros acidentais da doença. O contato direto com sangue, urina, tecidos e órgãos do animal infectado é considerado fator de risco para a transmissão da leptospirose e pode afetar principalmente

determinadas ocupações profissionais como aquelas desempenhadas por veterinários, fazendeiros, açougueiros, militares, catadores de lixo, cientistas e tratadores do sistema de esgoto e do controle de roedores, entre outras ocupações que demandam o contato com os animais (Steneroden et al., 2011). Além disso, como mencionado anteriormente a transmissão também ocorre através do contato indireto com a água ou solo contaminados após a disseminação das leptospiras pela urina dos animais infectados (Smythe et al., 1997; Levett, 2001).

Na fase aguda, os pacientes geralmente apresentam febre, fadiga, calafrios, fortes dores de cabeça, mal-estar, fotofobia, dor retro-orbital, e, de forma incomum a outras doenças, podem ainda apresentar hemorragia conjuntival (Haake, Levett, 2015). Outros possíveis sintomas incluem tosse, dores articulares e manchas pelo corpo (Zaki, Shanbag, 2010). Alguns dos sintomas apresentados durante a fase aguda são semelhantes aos sintomas de outras doenças de infecções virais, o que pode acarretar um diagnóstico incorreto em muitos casos. Por esta razão, alguns casos de leptospirose muitas vezes não são corretamente diagnosticados e notificados (Burt et al., 2012; Taylor et al., 2015).

Dores abdominais, náuseas, diarreia e vômitos são sintomas gastrointestinais que podem contribuir para casos de desidratação. Se o paciente evoluir para um quadro mais avançado da infecção, os sintomas podem progredir para complicações relacionadas à icterícia, insuficiência renal e hepática, meningite, miocardite e uveíte (Bharti et al., 2003). A gravidade da doença implica na disfunção de múltiplos órgãos. No fígado e nos pulmões frequentemente são observadas intensas hemorragias, enquanto nos rins, a inflamação resulta em nefrite intersticial caracterizada por edema e infiltração de células inflamatórias (Yang et al., 2006).

O diagnóstico para a leptospirose baseia-se na avaliação geral do paciente, histórico de exposição a eventuais locais de risco, além da apresentação clínica dos sintomas característicos da doença (Ko et al., 1999; Ooteman et al., 2006; Bharti et al., 2003). Os testes sorológicos são os mais frequentemente utilizados para o diagnóstico de leptospirose. A detecção de anticorpos IgG específicos geralmente pode ser observada a partir da segunda semana pós-infecção e podem ser detectados pelos métodos como *Enzyme Lynked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) ou por Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) (Picardeau, 2013). O MAT consiste na pesquisa de anticorpos no soro de um paciente infectado, quando este é misturado a um painel de antígenos de leptospiras vivas em várias diluições. O resultado do é positivo,

quando os anticorpos aglutinam com pelo menos um dos sorovares de leptospira (World Health Organization, 2003).

Outros ensaios moleculares como reação em cadeia com DNA polimerase (PCR) ou PCR quantitativo em tempo real (qPCR) também corroboram para a pesquisa das espiroquetas em amostras de sangue ou urina, permitindo a identificação ou até mesmo quantificação de leptospiras presentes no hospedeiro infectado (Fukunaga, Mifuchi, 1989; Picardeau, 2013).

O tratamento é feito sob a administração oral de duas drogas antimicrobianas: a doxaciclina e a azitromicina para os pacientes que apresentam as formas leves da doença. Os pacientes acometidos com as formas graves necessitam de intervenção hospitalar, administração de antibióticos como a ampicilina via intravenosa ou intramuscular, além de terapias de suporte para redução das taxas de mortalidade (Levett, 2001).

A vacinação contra a leptospirose para seres humanos ainda não foi introduzida no Brasil e há vacinas apenas para uso em animais. Apenas alguns países como Cuba, China, Rússia, Japão e França, disponibilizam a vacina para pessoas que vivem em situações de risco. São preparações de bacterinas (leptospiras inativadas pelo calor), que conferem baixa proteção e induzem imunidade em curto prazo, sendo necessárias anualmente doses de reforço da vacina (Haake, Levett, 2015; Dellagostin et al., 2017).

1.2 Leptospiras

As leptospiras são bactérias do tipo espiroqueta e pertencem à família *Leptospiraceae* de ordem *Spirochaetales*, distribuídas em 3 gêneros: *Leptospira* spp., *Leptonema* spp. e *Treponema* spp. (Faine et al., 1999). São bactérias finas, móveis e apresentam uma forma característica típica helicoidal com extremidades em forma de ganchos (Levett, 2001) (**Figura 2**).

No espaço periplasmático, as leptospiras apresentam flagelos, que impulsionam seu movimento em dois sentidos, rotação e translação (Bharti et al., 2003). Quanto ao tamanho medem entre 0,1-0,2 µm de largura e de 6 a 20 µm de comprimento com uma amplitude helicoidal de aproximadamente 0,1-0,15 µm e de 0,5 µm de comprimento (Levett, 2001; Schreier et al., 2009).

Figura 2 - *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae.

Microscopia eletrônica de varredura da *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae aderidas em uma membrana de 0,22 μm (Levett, 2001).

As leptospiros possuem um envoltório celular com dupla membrana, sendo a membrana interna revestida por uma espessa camada de peptidoglicano e a membrana externa por lipopolissacarídeo (LPS), proteínas, lipoproteínas e lipídeos (Haake, 2000; Evangelista, Coburn, 2010) (**Figura 3**). O LPS das leptospiros é semelhante ao LPS de outras bactérias Gram-negativas e seu reconhecimento como observado na maioria das bactérias Gram-negativas é predominantemente detectado por receptores semelhantes a Toll tipo 4 (TLR-4) (Goris et al., 2011). Entretanto, diferenças na composição do lipídeo A das leptospiros, região responsável pela atividade endotóxica do LPS, permitem que as leptospiros sejam reconhecidas por macrófagos humanos apenas por TLR-2. Ao contrário dos macrófagos humanos, o LPS das leptospiros é reconhecido principalmente por macrófagos murinos por TLR-2, mas TLR-4 também contribui para a ativação e sinalização celular (Nahori et al., 2005; Werts, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática da dupla membrana de leptospiros.

A dupla membrana das leptospiros é composta por uma membrana interna estritamente associada à camada de peptidoglicano. A membrana externa é composta por LPS e uma série de lipoproteínas como LipL32, LigA, LigB, Loa22 e a proteína porina OmpL1 (Fraga et al., 2011).

As leptospiros são bactérias aeróbicas obrigatórias, multiplicam-se melhor em temperaturas entre 28 °C e 30 °C no pH 7,2 e 7,6. Para o cultivo das leptospiros são utilizados meios especiais como o *Ellinghausen-McCullough-Johnson Harris* (EMJH), suplementado com 10% de soro de coelho ou 1% de albumina sérica com adição de ácidos graxos de cadeia longa. O crescimento do número de leptospiros leva de 4 a 7 dias e pode ser acompanhado por microscopia óptica sob campo escuro (Faine et al., 1999).

Tradicionalmente, existem dois tipos de classificação para diferenciar as espécies, onde o primeiro baseia-se na composição variável de carboidratos que formam o LPS, tendo como base mais de 200 sorovares distribuídos em 23 sorogrupos. O segundo sistema de classificação baseia-se na caracterização genômica entre as espécies, apoiando-se em experimentos de hibridação do DNA (Levett, 2001; Ko et al., 2009; Evangelista, Coburn, 2010). A análise filogenética baseada no sequenciamento do gene *16S rRNA* indica que existem três grupos de leptospiros que incluem espécies patogênicas, espécies saprófitas de vida livre e outras espécies classificadas como um grupo intermediário, cuja patogenicidade

causa sintomas leves e sem complicações fatais (Ko et al., 2009; Chiriboga et al., 2015) (**Figura 4**). Recentemente foi descrita uma nova espécie do gênero denominada *Leptospira idonii* e sua patogenicidade ainda é incerta (Saito et al., 2013).

Figura 4 - Classificação das Leptospiras.

(Modificado de: Picardeau, 2017).

1.3 Sistema Complemento

O Sistema Complemento (SC) é conhecido por ser um dos participantes mais importantes da imunidade do hospedeiro, sua contribuição é fundamental para o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente, auxiliando outros elementos celulares, como fagócitos e linfócitos B e modulando ativamente as respostas imunes inatas e adaptativas (Walport, 2001).

Seu repertório é constituído e organizado por proteínas solúveis e proteínas associadas a superfícies celulares. A ativação do SC pode ocorrer por ativação de três importantes vias: Via Clássica, Via das Lectinas e Via Alternativa (Walport, 2001; Nesargikar et al., 2012) (**Figura 5**). Quando ocorre ativação do SC por qualquer uma das vias, os componentes interagem entre si sequencialmente, formando cascatas enzimáticas complexas que terminam com a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), um complexo lítico que culmina em lise e morte celular (Morgan, Harris, 1999).

Figura 5 - As vias de ativação do Sistema Complemento.

O SC pode ser ativado por três diferentes vias: Via Clássica, Via das Lectinas e Via Alternativa. As C3-convertases das Via Clássica e Via das Lectinas são geradas geralmente na presença das moléculas C2 e C4 por complexos de antígeno-anticorpo ou por interações de ligação de Lectinas com resíduos de carboidratos nas superfícies microbianas, respectivamente. A Via Alternativa é iniciada pela hidrólise espontânea da ligação tiol-éster de C3 seguida pela ligação de Fator B (FB) e posterior clivagem pelo Fator D (FD), gerando as C3-convertases desta via. Por meio das C3-convertases mais moléculas de C3 são clivadas, gerando C3b. A associação dos fragmentos C3b às C3-convertases, formam as C5-convertases que participam da clivagem de C5 em C5a e C5b. Ao final das cascatas inicia-se a formação do MAC, quando o C5b ainda associado a C5-convertase liga-se as moléculas C6, C7, C8 e C9 (Walport, 2001).

1.3.1 Via Clássica

A Via Clássica foi a primeira a ser descrita; sua ativação é dependente principalmente do reconhecimento de complexos antígeno-anticorpo por moléculas C1q, pertencentes ao complexo C1 (Ehrlich, Morgenroth, 1900). O complexo C1 é formado por um conjunto de subunidades conhecidas como C1q, C1r e C1s. A atividade desse complexo é dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e magnésio (Mg^{++}) e, após a ligação de C1q à porção Fc dos anticorpos IgM ou IgG, ocorre a ativação da serino protease C1r, que cliva a subunidade C1s (Lacroix et al., 1989). A ativação de C1s resulta na clivagem das proteínas C2 e C4. A clivagem de C4 gera dois fragmentos, C4b um fragmento maior que se deposita sobre superfícies celulares e mais um fragmento pequeno e solúvel com função desconhecida. Em seguida, ocorre a clivagem de C2, em C2a e C2b, o C2b permanece ligado ao C4b, formando o complexo enzimático C3-convertase (C4bC2a), os quais levam a clivagem e ativação do componente C3, após a formação do complexo enzimático C3-convertase. No complexo, C2b atua como serino protease, clivando C3 em C3a e C3b, e com a clivagem de moléculas C3, modulam a formação de outro complexo conhecido como C5-convertase (C4bC2aC3bn) pela adição do fragmento C3b à C3-convertase (Pangburn, Rawal, 2002).

1.3.2 Via das Lectinas

A Via das Lectinas é iniciada pelo reconhecimento de carboidratos presentes na superfície de microrganismos. As lectinas *mannose binding lectin* (MBL) ou ficolinas interagem com carboidratos ou resíduos acetilados presentes exclusivamente na superfície dos patógenos, sendo ambas associadas a três serino-proteases conhecidas como *MBL-associated serino protease* (MASP-1, MASP-2 e MASP-3) (Turner, 1996; Schwaeble et al., 2002). Essas lectinas apresentam similaridade estrutural e funcional com a proteína C1q. Na presença de Ca^{++} e Mg^{++} , MASP-1 apresenta função homóloga a C1s, ativando MASP-2. Além disso, MASP-1 também promove a clivagem da proteína C2. No entanto, apenas a MASP-2 pode iniciar a formação da C3-convertase C4bC2a da Via das Lectinas, uma vez que, MASP-2 é capaz de clivar as proteínas C2 e C4, gerando os fragmentos C2a e C4b

(Matsushita, Fujita, 1992; Thiel et al., 1997). A MASP-3 possui atividade regulatória sobre MASP-2 e inibe a clivagem das moléculas C2 e C4, atuando como um regulador negativo da Via das Lectinas (Dahl et al., 2001).

O restante do processo de ativação dessa via é similar ao que ocorre na Via Clássica, na qual as atividades desses complexos C4bC2a apresentarão a mesma finalidade de clivar mais moléculas C3 para formar as C3- e C5-convertases (C4bC2aC3bn).

1.3.3 Via Alternativa

A Via Alternativa é continuamente ativada em condições fisiológicas normais do hospedeiro. Esta via é iniciada pela hidrólise espontânea da ligação tiól-éster encontrada na cadeia α intacta do C3 nativo (Law et al., 1979). A C3(H₂O) formada possui sítio de ligação para o Fator B (FB). Tal ligação ocorre na presença de íons Mg⁺⁺ e, uma vez ligado, o FB sofre ação proteolítica do Fator D (FD) gerando os fragmentos Ba e Bb. O fragmento Bb permanece ligado a C3(H₂O), formando a primeira C3-convertase da Via Alternativa, a C3(H₂O)Bb (Lachmann, Hugher-Jones, 1984; Law, Dodds, 1990). Os níveis de deposição de C3 podem ser aumentados por uma alça de amplificação da Via Alternativa. A molécula properdina, que opera exclusivamente nesta via promove a estabilidade dos complexos C3-convertases, que clivam C3 em C3a e C3b (Medicus et al., 1976). Uma vez que as moléculas C3b se associam ao FB, e este pode sofrer posterior clivagem pelo FD e conseqüentemente geram a segunda C3-convertase conhecida como C3bBb (Fearon et al., 1973).

No segundo momento de ativação da Via Alternativa, o complexo C3bBb participa na clivagem de mais moléculas C3 e a contínua deposição de C3b nas imediações, favorecendo a formação da C5-convertase (C3bBbC3bn). A C5-convertase cliva a proteína C5 em C5a e C5b. O C5b se associa a C6, C7, C8 e C9, culminando na gênese do MAC, da mesma maneira como ocorre nas outras vias de ativação do SC.

1.3.4 Complexo de Ataque à Membrana

O MAC é formado ao final da ativação das três cascatas do SC. Iniciado pelo complexo C5-convertase, o fragmento C5b ainda associado a esta enzima passa a interagir com a proteína C6, que por sua vez, é capaz de interagir com a proteína C7 em fase aquosa. Os componentes C6 e C7 são as primeiras moléculas que se associam ao fragmento C5b, formando o complexo C5b67, o qual é inserido na membrana plasmática, permitindo a inserção da proteína C8. Para a formação completa do MAC, várias moléculas de C9 também são incorporadas na membrana alvo (C5b6789_n), formando um grande poro de atividade citotóxica, culminando em lise celular osmótica (Morgan, Harris, 1999) (**Figura 6**).

Figura 6 - Complexo de Ataque à Membrana.

Com a clivagem de C5 pelas C5-convertases são gerados os fragmentos C5a e C5b. A molécula C5a é libertada na circulação e o C5b associado a C5-convertase passa a interagir com as moléculas C6, C7, C8 e várias moléculas de C9, gerando um grande poro na bicamada lipídica conhecido como MAC (Aleshin et al., 2012).

1.4 Funções do Sistema Complemento

O SC participa dos mecanismos de ação desenvolvidos contra bactérias invasoras e na eliminação de diversos outros patógenos. Ativado por esses microrganismos, numerosos produtos são gerados durante a sua ativação, que vão exibir potentes estímulos designados para permitir a ativação da resposta imunológica (Ricklin et al., 2010).

A sequência de eventos após a ativação do SC pode incluir a geração de anafilotoxinas, como os fragmentos C3a e C5a, conhecidos como potentes mediadores pró-inflamatórios. Ambos possuem funções comuns relacionadas a processos que envolvem a capacidade de orientar a migração de leucócitos circulantes para os tecidos, estimular mastócitos e basófilos a liberarem histamina, ativar células endoteliais, aumentando a expressão de moléculas de superfícies como $\beta 2$ integrina, auxiliar na geração de citocinas e oxidantes em células fagocíticas e promover a ativação dos complexos inflamassomas (Dias da Silva, 1967; Johnson et al., 1975; Elsner et al., 1994; Ember et al., 1994; Foreman et al., 1994; Daffern et al., 1995; Hartmann et al., 1997; Albrecht et al., 2004; Laudisi et al., 2013).

O SC também coopera com as células fagocíticas, uma vez que são recrutadas por quimiotaxia pelos fragmentos C3a e C5a para o sítio inflamatório, essas células internalizam agentes infecciosos via receptores de superfície tais como TLRs, receptores de manose (MRs), receptores de Complemento (CRs) e receptores para porção Fc de anticorpos IgG (FcYRs) (Underhill, Goodridge, 2012).

O C1q e os fragmentos C3b, iC3b e C4b, são opsoninas que se fixam na superfície de microrganismos e células apoptóticas. Essas moléculas intensificam o processo de fagocitose, uma vez que a opsonização por estas aumenta a habilidade de macrófagos e neutrófilos em fagocitar os microrganismos e promover a eliminação das partículas alvo (Bohlsón et al., 2014).

Os CRs estão presentes nos macrófagos e a fagocitose mediada por esses receptores ocorre por um processo dependente de uma variedade de proteínas do citoesqueleto, como F-actina, vinculina, paxilina, entre outras. Após a ligação das opsoninas complexadas aos antígenos aos receptores específicos permitem a formação de pequenos pseudópodes. Essa interação é suficiente para permitir a ingestão do microrganismo e a subsequente fagocitose. A internalização destas partículas por CRs requer a participação de microtúbulos e é acompanhada pelo acúmulo de vesículas compostas por proteínas do citoesqueleto que formam o fagossomo (Aderem, Underhill, 1999).

Mediante a interação de C1q e C3b com os receptores CR1 presentes em macrófagos, neutrófilos e outras células sanguíneas ocorrem o processo de adesão de células apoptóticas, debris celulares e de imunocomplexos presentes na circulação (Korb, Ahearn, 1997). A opsonização dessas partículas com os fragmentos do SC promove o deslocamento destas para o fígado e baço, onde serão removidas por

macrófagos teciduais. Além disso, as células de Kupffer murinas expressam o *complement receptor of the immunoglobulin superfamily* (CRIg), capaz de interagir com o fragmento C3b ligado ao antígeno, resultando no processo de fagocitose (Cornacoff et al., 1983; Klickstein et al., 1997; Helmy et al., 2006).

Como opsonina, o fragmento iC3b é considerado mais potente do que os outros fragmentos do SC, já que apresenta alta afinidade de interação com receptores pertencentes à família das integrinas caracterizados por CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18), bem como com o CRIg, cuja interações promovem a fagocitose de microrganismos por macrófagos (Johnson et al., 1984; Ezekowitz et al., 1985; van Lookeren Campagne et al., 2007).

Macrófagos também podem secretar componentes do SC, especialmente elementos que compõem a Via Alternativa, tais como FB, FD, C3, C5 e properdina (Hartung, Hadding, 1983). A liberação dos componentes no meio extracelular pode culminar na geração de C3-convertases, clivando os fragmentos C3 em C3a e C3b, e a ação local desses mediadores pode aumentar os processos de opsonização, bem como de fagocitose (Ezekowitz et al., 1984). Além disso, a properdina também pode se ligar a partículas alvos, podendo contribuir tanto para os processos de opsonização quanto para a fagocitose (Flierman, Daha, 2007; Kemper et al., 2008).

As proteínas do SC também estão envolvidas na regulação e ativação dos linfócitos T devido à secreção local de C3a para o meio extracelular. A anafilotoxina C3a é importante para manter a sobrevivência dos linfócitos T e, quando em cooperação com a opsonina C3b, pode induzir a diferenciação dos linfócitos TCD4⁺ para o padrão TH1, sendo essa função importante para a secreção da citocina pró-inflamatória IFN-gama (IFN- γ) (Kolev et al., 2015).

Linfócitos T ativados também são capazes de secretar o componente C3 e a clivagem intracelular da molécula ocorre mediante ação de enzimas catepsinas L (Liszewski et al., 2013), tais fragmentos gerados localmente podem contribuir para a modulação de linfócitos T humanos. Em camundongos, a modulação de linfócitos T pode ser influenciada por C3a, entretanto, a clivagem extracelular de C3 é dependente da formação das C3-convertases, gerada após a secreção de C3, FB e FD, proteínas que compõem estes complexos (Lalli et al., 2008; Strainic et al., 2008).

A ativação dos linfócitos B inicia-se pela interação do receptor para antígenos (BCR) presente na superfície celular, representado por (IgM e IgD) e duas cadeias polipeptídicas (Ig α e Ig β), responsáveis por desencadear uma sequência de eventos

intracelulares (Batista, Harwood, 2009). A influência do SC na sinalização dos linfócitos B ocorre a partir da existência de um complexo trimolecular caracterizados pelo CR2 e por duas outras proteínas denominadas como CD19-CD81 presentes nessas células, o qual tem função de interagir com os antígenos opsonizados com os fragmentos iC3b, C3d e C3d(g) (Fang et al., 1998; Carroll, Isenman, 2012).

Existem duas modalidades distintas para a interação do antígeno opsonizado com os fragmentos ligados ao CR2: 1) a primeira função ocorre na superfície celular do linfócito B, no qual o receptor BCR atua em conjunto com os correceptores CD19-CD81 potencializando a ativação e expansão clonal dos linfócitos B, e, 2) a segunda função envolve os processos de maturação de afinidade, troca de isótipo, geração de linfócitos B efetores de memória, ocorrendo em centros germinativos com a participação de células foliculares dendríticas, cuja interação dos receptores CR2 com antígenos opsonizados com os fragmentos derivados de C3 garante a retenção prolongada do antígeno nesses locais para o reconhecimento por linfócitos B (Ahearn et al., 1996; Fischer et al., 1996; Roozendall, Carroll, 2007).

1.5 Sistema Complemento e leptospiros

A importância do SC contra as leptospiros é denotada pela eliminação eficiente de algumas estirpes saprofíticas, enquanto outras estirpes que apresentam fatores de virulência não são eliminadas pelos seus mecanismos (Meri et al., 2005; Barbosa et al., 2009). Estudos anteriores realizados por nosso grupo demonstraram que as leptospiros patogênicas são capazes de secretar proteases que promovem a clivagem de importantes proteínas que compõem as três vias de ativação do Sistema Complemento, tais como: C3, C3b, C4b, iC3b, FB e C2 e também as proteínas C6, C7, C8 e C9 que compõem o MAC. Nesses estudos foram utilizados sobrenadantes de culturas de espécies patogênicas como fonte de proteínas que interagissem com as proteínas pertencentes ao SC. Observou-se que essas bactérias apresentam uma classe de proteases que são secretadas nessas culturas e quando incubadas com as proteínas inativam as três vias do Complemento (Fraga et al., 2014; Amamura et al., 2017).

Outro estudo realizado por nosso grupo demonstrou uma interação entre o sistema fibrinolítico e o SC, onde as leptospiros patogênicas foram capazes de

interagir com o plasminogênio. Em sua forma ativa (plasmina) e proteínas *leptospiral immunoglobulin-like proteins* (Ligs) presentes na membrana externa dessas leptospiros. Os resultados revelaram que as leptospiros, por meio de suas proteínas de membrana LigA e LigB interagiram com o plasminogênio gerando plasmina, esta capaz de degradar as proteínas C3, C3b e C5 (Castiblanco-Valencia et al., 2016).

Além disso, também foi demonstrado que as leptospiros patogênicas interagem com os reguladores Fator H (FH) e C4b-binding protein (C4BP). O FH atua na Via Alternativa, inibindo a ligação do fragmento Bb ao C3b, impedindo a formação e acelerando o decaimento da C3-convertase. O análogo processo regulatório ocorre na Via Clássica e na Via das Lectinas, quando a proteína C4BP está em atuação. A interação das leptospiros patogênicas com qualquer um dos reguladores pode representar um poderoso mecanismo de escape, uma vez que tanto o FH como o C4BP, são co-fatores para a atividade da serino-protease Fator I (FI), responsável pela clivagem das opsoninas C3b e C4b (Barbosa et al., 2009; Castiblanco-Valencia et al., 2012).

1.6 Resposta imune à leptospirose

A grande maioria dos estudos sobre o reconhecimento de padrões moleculares de leptospira centrou-se sobre o papel dos TLRs. Mediante o reconhecimento do LPS pelo TLR-4, são deflagradas vias que culminam na ativação do fator de transcrição nuclear *factor kappa b* (NF-kb) pela molécula adaptadora *myeloid differentiation primary response protein 88* (MyD-88), estimulando a produção de citocinas (Medzhitov et al., 1997; Adachi et al., 1998). Estes receptores são importantes para o reconhecimento das leptospiros em células murinas que reconhecem o LPS mediante a participação dos receptores TLR-2 e TLR-4, enquanto que em células humanas, o reconhecimento do LPS de leptospiros e sinalização dessa molécula ocorrem apenas pela via de TLR-2 (Nahori et al., 2005; Chassin et al., 2009).

Para demonstrar a importância da molécula TLR no reconhecimento das leptospiros em células murinas, nos estudos realizados por Viriyakosol et al. (2006) foram utilizados camundongos C3H/HeJ, pertencentes a uma linhagem que apresenta deficiência especificamente na molécula TLR-4 e, como resultado, foi observado que

esses animais foram susceptíveis à infecção letal causada pela estirpe patogênica *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae. Os animais desenvolveram os sintomas graves da doença, como disfunção hepática e renal, bem como hemorragia pulmonar. Além disso, também foram observados baixos níveis de citocinas inflamatórias, como interleucina (IL)-6 (IL-6) e *tumor necrosis factor* (TNF- α) em comparação com os camundongos selvagens.

Em camundongos infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni, foi demonstrado que TLR-2 e TLR-4 também estão envolvidos na sinalização de complexos inflamassomas. Como primeiro sinal, o LPS é reconhecido pelos TLRs e, em seguida, uma glicoproteína presente na membrana externa das leptospiros promove a regulação da bomba de Na⁺ e K⁺, levando à ativação de *Nod-like receptor protein 3* (NLRP3) e a secreção das citocinas IL-1 β e IL-18 (Lacroix-Lamandé et al., 2012).

Além do reconhecimento das leptospiros por TLR-2 e TLR-4, Cinco et al. (2002), demonstraram o envolvimento do CR3 presente em macrófagos murinos (receptor comum dos fragmentos C3b e iC3b) na interação direta de leptospiros fixadas à fibronectina, mediando a fagocitose sem opsoninas, uma vez que os receptores interagem com moléculas de adesão tais como: fibrinogênio, fibronectina, vitronectina entre outros componentes da matriz extracelular (Takada et al., 2007).

Os anticorpos desenvolvidos contra as leptospiros desempenham um papel fundamental na proteção da infecção por leptospirose. Adler e Faine (1976), concluíram que os anticorpos são essenciais para promover imunidade protetora, uma vez que os camundongos tratados com ciclofosfamida foram suscetíveis ao desafio letal por leptospiros. Tal substância é responsável pela inibição de linfócitos B (Turk, 1973). Jost et al. (1986) também demonstrou que os anticorpos foram importantes para proteger animais da infecção letal por leptospiros, os quais foram imunizados passivamente com anticorpos contra o LPS antes do desafio.

1.6.1 Os macrófagos na infecção por *Leptospira* spp.

Vários trabalhos foram realizados na tentativa de elucidar o papel dos macrófagos na fagocitose de leptospiros. Os macrófagos foram reconhecidos como um importante mecanismo de defesa imune, uma vez que a depleção de macrófagos

em camundongos tratados com sílica ocasionou a morte dos camundongos infectados com as leptospiros (Isogai et al., 1986).

Após o reconhecimento do microrganismo, a fagocitose ocorre com a formação do fagolisossoma, um processo em que promove a extensão da membrana fagocítica e posterior fusão com os grânulos lisossomais. Dentro desses compartimentos especializados ocorre a digestão intracelular dos microrganismos (Cohn, Hisch, 1960). A morte dos microrganismos dentro do fagolisossoma é controlada por diversas enzimas proteolíticas presentes nos lisossomos. Outro processo chave que ocorre na membrana dos fagolisossoma, é a geração de metabólitos oxidativos, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ânion superóxido (O_2^-), a partir da oxidação da enzima NADPH oxidase, um sistema conhecido como explosão respiratória (Bedard, Krause, 2007).

A enzima catalase, codificada pelo gene *katE* e expressa durante a fase de infecção por leptospiros, é uma molécula reconhecida por desempenhar um papel na infecção. Neste contexto, as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas durante a formação da explosão respiratória podem ser degradadas pela enzima catalase, conferindo as leptospiros resistência à capacidade destrutiva dos macrófagos (Eshghi et al., 2012).

Além dos ROS, a geração de NO complementa o quadro de ativação dos macrófagos, cujos efeitos também podem controlar e eliminar o agente patogênico. O NO é uma molécula intermediária do nitrogênio, sua síntese é dependente da metabolização da arginina, catalisado pela enzima óxido nítrico induzível sintetase (iNOS), cuja expressão ocorre por estímulos ao reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ativando TLRs, especialmente na presença de INF- γ (Mantovani et al., 2004).

Prêtre et al. (2011) observaram uma elevada produção do NO em camundongos e hamsters infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni, cujos efeitos da molécula reduziram a carga de leptospiros nos rins e diminuíram a mortalidade dos animais infectados. Além disso, também foi demonstrado que culturas de células de Kupffer, quando estimuladas com a lipoproteína LipL32 das leptospiros, produzem intermediários de nitrogênio que podem controlar e inibir a replicação das leptospiros (Yang et al., 2002).

Em outro estudo realizado com as espiroquetas, os anticorpos foram considerados como os elementos mais importantes para a opsonização de

leptospiras, facilitando a internalização destas bactérias por monócitos e macrófagos (Faine et al., 1964; Banfi et al., 1982; Wang et al., 1984).

A polimerização da actina desempenha um papel importante na movimentação do microrganismo para o interior da célula no processo de fagocitose (Aderem, Underhill, 1999). Em estudos utilizando uma linhagem de células de macrófagos murinos J774A.1, foi demonstrado que a internalização das leptospiras foi mediada por endocitose, uma rota independente da polimerização dos filamentos de actina, sugerindo que a entrada das leptospiras foi independente de fagocitose. Além disso, a presença de leptospiras nos compartimentos vesiculares foi confirmada pelo marcador da proteína de membrana associado aos lisossomos (LAMP-1). Dessa forma, os autores sugeriram que as leptospiras poderiam evitar a ativação de outros mecanismos de ação desencadeados por esta via fagocítica (Liu et al., 2007). Entretanto, foi observado que as leptospiras fagocitadas pela linhagem de macrófagos humanos THP-1 escapam para o citosol e ainda são capazes de sobreviver e se replicar nessas células (Li et al., 2010).

O processo de apoptose é um tipo de morte celular programada e trata-se de um mecanismo que pode ser utilizado pelos patógenos para escapar da morte pelos fagócitos, como por exemplo, as bactérias *Listeria monocytogenes* e *Shigella flexneri*, utilizam do mecanismo para escapar dos macrófagos e serem libertadas para o meio extracelular (Zychlinsky et al., 1992; Barsig, Kaufmann, 1997). Em um estudo realizado por Jin et al. (2009), foi relatado que a *L. interrogans* sorovar Lai foi capaz de induzir apoptose nos macrófagos por meio da ativação de proteases, mais especificamente, pelas vias das caspases-3 e caspases-8.

Estudos relatam que as leptospiras patogênicas são capazes de sobreviver e se multiplicar dentro e fora dos macrófagos (Cinco et al., 1981). Na tentativa de distinguir mecanismos intracelulares após a fagocitose de leptospiras patogênicas por macrófagos murinos foi utilizada a *L. interrogans* sorovar Manilae UP-MMC-NIID. Os autores observaram que a estirpe não foi capaz de induzir apoptose nos macrófagos murinos, mesmo sendo esta considerada uma estirpe altamente virulenta. Suas conclusões foram baseadas em observações microscópicas que mostraram leptospiras intactas dentro dos vacúolos fagocíticos, aumento e replicação das leptospiras nesses compartimentos e liberação das espiroquetas no meio extracelular após 24 horas de incubação e sem causar apoptose celular (Toma et al., 2011).

Estudos que possam determinar a interação dos fatores de virulência das leptospiros com macrófagos humanos e murinos ainda são limitados. Apenas dois destes estudos confirmam que as proteínas de membrana externa LMB 216 e LigB, como tendo um papel na infecção dos macrófagos murinos, promovendo o aumento da taxa de absorção das leptospiros (Toma et al., 2014).

Diante das diversidades dos mecanismos de fagocitose, nosso grupo deseja aprofundar os conhecimentos acerca dos processos de fagocitose a fim de explorar e entender a participação do SC na opsonização destas bactérias.

1.7 Proteína C3

C3 é uma molécula que desempenha inúmeras funções após sua clivagem pelas C3-convertases. Além das C3-convertases, outras moléculas como a trombina podem assumir ação enzimática sobre C3, o que consequentemente leva à geração dos fragmentos ativos como C3a e C3b (Lambris, 1988; Huber-Lang et al., 2006).

O gene C3 humano está localizado no cromossomo 19 e a proteína é composta pela cadeia α (110 kDa) e cadeia β (75 kDa), unidas entre si por pontes dissulfeto. Sua concentração sérica corresponde a aproximadamente 1,2 mg/ml em humanos (Lambris, 1988; Morley, Walport, 2000).

A proteína C3 é sintetizada como uma pró-molécula que sofre modificações pós-traducionais que incluem a clivagem do peptídeo sinal (22 aa), remoção de uma sequência de 4 argininas, glicosilação e formação da ligação tiol-éster intracadeia (Law et al., 1979).

Sintetizada principalmente pelos hepatócitos, a produção desta proteína é influenciada pelos mediadores: IL-1, IL-6, TNF- α e INF- γ , os quais induzem a síntese da proteína C3 na fase aguda em diversos tipos celulares, como monócitos/macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais, mioblastos, células T, astrócitos, células mesangiais glomerulares, adipócitos, osteoblastos, células epiteliais intestinais e células dendríticas (Botto et al., 1992; Morley, Walport, 2000; Reis et al., 2006).

A molécula C3 apresenta um amplo espectro de interações por meio de determinados fragmentos gerados nas clivagens enzimáticas dessa proteína. Com a clivagem de C3, o componente iC3b é gerado após o fragmento C3b sofrer clivagem

pelo FI na presença dos cofatores *membrane cofactor protein* (MCP), FH e do receptor CR1 que atuam na regulação do SC. Com esta clivagem ocorre a liberação dos fragmentos C3f e o iC3b pode sofrer mais uma clivagem adicional pelo FI, gerando o fragmento C3c e C3d(g), os quais podem ser posteriormente clivados em C3d e C3dg por proteases plasmáticas (Lambris, 1988; Morley, Walport, 2000) (**Figura 7**).

Figura 7 - Representação esquemática da clivagem de C3 e seus fragmentos.

As enzimas C3-convertases clivam a proteína C3, culminando na geração dos fragmentos C3a e C3b. O fragmento C3b pode ser clivado pelo FI, na presença dos cofatores: Fator H, MCP, CR1. O fragmento iC3b, é gerado após conversão do C3b e liberação dos fragmentos C3c e C3dg, os quais podem ser clivados em C3d e C3g por proteases plasmáticas (Modificado de Botto, 2000).

1.8 Modelo animal

Modelos animais têm sido utilizados para avaliar fatores de virulência associados à patogênese da doença, fisiologia da inflamação, bem como, mecanismos que geram a resposta imune contra as leptospiros. Os roedores são considerados os principais hospedeiros de manutenção e são animais resistentes à

leptospirose. Embora eles não consigam reproduzir a mesma condição de leptospirose humana durante a fase aguda, os animais acabam desenvolvendo os sintomas crônicos da doença. Além disso, modelos murinos que apresentam deficiências específicas em um determinado gene de interesse, têm sido fundamentais para a descoberta de fatores importantes para o controle da doença. Como, por exemplo, os camundongos C3H/HeJ deficientes em TLR-4, foram importantes para compreender o reconhecimento das leptospiras por células imunes (Viriyakosol et al., 2006).

Os hamsters são animais que apresentam os sinais de infecção semelhantes aos da infecção humana. Entretanto, estes animais são mais utilizados para testes de vacina ou para restauração da virulência das estirpes de leptospiras e não são considerados modelos apropriados para o estudo da doença. Além disso, não existem modelos destes animais com diferentes perfis genéticos e também faltam reagentes específicos para estudos com hamsters, o que impossibilita o desenvolvimento de técnicas utilizadas na pesquisa (Gomes-Solecki et al., 2017).

Utilizando modelos experimentais murinos, dois trabalhos foram desenvolvidos por nosso grupo. O primeiro trabalho foi realizado para investigar a importância do componente C5 na resposta *in vivo* à infecção por *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm. Os resultados demonstraram que a proteína C5 é importante para conferir proteção dos animais nos primeiros dias de infecção. Além disso, os camundongos C5 deficientes apresentaram maior quantidade de bactérias nos órgãos alvo e um menor número de células T, dependentes da estimulação de C5a, em comparação com os animais selvagens (Castro, 2014).

Concomitante a este estudo, outro trabalho foi desenvolvido por nosso grupo, utilizando o mesmo modelo murino deficiente da proteína C3, onde foi explorado *in vivo* a importância de C3 na infecção destes animais por *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm. Os principais resultados mostraram que o componente C3 é importante para eliminação das leptospiras patogênicas, uma vez que foi mostrado *in vitro*, maior sobrevivência dessas bactérias na presença do soro deficiente do camundongo B6.C3^{-/-}. Além disso, no fígado, baço e rins dos camundongos deficientes em C3, foram encontrados maior número de leptospiras em comparação com os camundongos selvagens (Vassalakis, 2017).

Para dar continuidade aos estudos que já foram caracterizados, neste projeto escolhemos utilizar a mesma espécie patogênica para avaliar a importância da proteína C3 na opsonização e produção de anticorpos contra *L. interrogans*.

7 Conclusão

- ✓ A produção de anticorpos específicos anti-leptospira ou anti-LigBC foi dependente da proteína C3 do Sistema Complemento.

- ✓ Quando comparada com a *L. biflexa* a *L. interrogans* é menos fagocitada por macrófagos peritoneais quando opsonizada com C3, a ingestão é facilitada.
- ✓ Os macrófagos peritoneais de camundongos B6.C3^{+/+} apresentaram melhor capacidade de fagocitar *L. interrogans*, ao contrário dos macrófagos de camundongos B6.C3^{-/-}.
- ✓ A produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados com *L. interrogans* não é dependente de C3.
- ✓ A ausência de C3 provoca diminuição da secreção de citocinas IL-10, IL-12p70 e TNF- α nas culturas de macrófagos infectados com *L. interrogans*.

Referências*

Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. 1998 Jul;9(1):143-50.

Adams HR. Pshysiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *J Am Med Assoc* 1996; 209:1297-302.

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:593:623.

Adler B, Faine S. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* serovar Pomona. *Infect. Immun.* 1976;14:703-8.

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

Ahearn JM, Fischer MB, Choix D, Goerg S, Ma M, Xia J, Zhou X, Howard RG, Rothstein TL, Carroll MC. Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity.* 1996 Mar;4(3):251-62.

Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, Kumar-Sinha C, Barrette TR, Sarma JV, Ward PA. C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol.* 2004 Mar;164(3):849-59.

Aleshin AE, Schraufstatter IU, Stec B, Bankston LA, Liddington RC, DiScipio RG. Structure of complement C6 suggests a mechanism for initiation and unidirectional, sequential assembly of membrane attack complex (MAC). *J Biol Chem.* 2012 Mar 23;287(13):101210-22.

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 May 30;8:958.

Banfi E, Cinco M, Bellini M, Soranzo MR. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospires. *J Gen Microbiol* 1982;128:813–6.

Barbosa AS, Abreu PA, Vasconcellos SA, Morais ZM, Gonçalves AP, Silva AS, Dahan MR, Isaac L. Immune evasion of *leptospira* by acquisition of human complement regulation C4BP. *Infect Immun.* 2009 Mar;77(3):1137-43.

Barsig J, Kaufmann SH. The mechanism of cell death in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages is distinct from apoptosis. *Infect Immun.* 1997 Oct;65(10):4075-81.

*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.html

Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol.* 2009 Jan;9(1):15-27.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87(1):245-313.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Mathias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003.Dec;3(12):752-71.

Bohlson SS, O'Conner SD, Hulsebus HJ, Ho MM, Fraser DA. Complement c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front Immunol*. 2014 Aug 21;5:402.

Botto M, Lissandrini D, Sorio C, Walport MJ. Biosynthesis and secretion of complement component (C3) by activated human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 1992 Aug 15;149(4):1348-55.

Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet*. 2012 Feb 18;379(9816):662-71.

Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity*. 2012 Aug 24;37(2):199-207.

Carroll MC. Complement and humoral immunity. *Vaccine* 2008 Dec 30;26 Suppl 8:128-33.

Carter RH, Fearon DT. CD19:lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science*. 1992 Apr 3;256(5053):105-7.

Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Breda LC, Vasconcellos SA, Figueira CP, Picardeau M, Wunder E, Ko AL, Barbosa AS, Isaac L. Acquisition of negative complement regulators by the saprophyte *Leptospira biflexa* expressing LigA or LigB confers enhanced survival in human serum. *Immunol Lett*. 2016 May;173:61-8.

Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Pagotto AH, Serrano SM, Abreu PA, Barbosa AS, Isaac L. Plasmin cleaves fibrinogen and the human complement proteins C3b and C5 in the presence of *Leptospira interrogans* proteins: A new role of LigA and LigB in invasion and complement immune evasion. *Immunobiology*. 2016 May;221(5):679-89.

Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB, Monaris D, Abreu PA, 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. *J Infect Dis*. 2012 Mar 15;205(6):995-1004.

Castiblanco-Valencia MM. Interação de proteínas de membrana de leptospira com os reguladores Fator H e C4BP do sistema complemento humano. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Castro JA. Importância do componente C5 do Sistema Complemento para o controle de leptospirose in vivo em modelos murinos. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials*. 2004 Feb;25(5):843-50.

Chassin C, Picardeau M, Gounjon JM, Bourhy P, Quellard N et al. TLR-4 and TLR-2-mediated B cell response control the clearance of the bacterial pathogen *Leptospira interrogans*. *J Immunol*. 2009;183(4):2669-77.

Chiriboga J, Barragan V, Arroyo G, Sosa A, Birdsell DN, España K, Mora A, Espín E, Mejía ME, Morales M, Pinargote C, Gonzalez M, Hartskeerl R, Keim P, Bretas G,

Eisenberg JN, Trueba G. High Prevalence of Intermediate *Leptospira* spp. DNA in Febrile Humans from Urban and Rural Ecuador. *Emerg Infect Dis*. 2015 Dec;21(12):2141-7.

Cinco M, Banfi E, Soranzo MR. Studies on the interaction between macrophages and leptospires. *J Gen Microbiol*. 1981 Jun;124(2):409-13.

Cinco M, Cini B, Perticarari S, Presani G. *Leptospira interrogans* binds to the CR3 receptor on mammalian cells. *Microb Pathog*. 2002 Dec;33(6):299-305.

Cohn ZA, Hirsch JG. The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*. 1960 Dec 1;112:1015-22.

Colagross-Schouten AM, Mazet JA, Gulland FM, Miller MA, Hietala S. Diagnosis and seroprevalence of leptospirosis in California sea lions from coastal California. *J Wildl Dis*. 2002 Jan;38(1):7-17.

Cornacoff JB, Hebert LA, Smead WL, VanAman ME, Birmingham DJ, Waxman FJ. Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *J Clin Invest*. 1983 Feb;71(2):236-47.

Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgeson 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 Sep 17;9(9):e0003898.

Daffern PJ, Pfeifer PH, Ember JA, Hugli TE. C3a is a chemotxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *J Exp Med*. 1995 Jun 1;181(6):2119-27.

Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC et al. MASP-3 and its Association with distinct complexes of the mannan-binding lectin Complement activation pathway. *Immunity*. 2001;15(1):127-35.

Davies BW, Bogard RW, Dupes NW, Gerstenfield TA, Simmons LA, Mekalanos JJ. DNA damage and reactive nitrogen species are barriers to *Vibrio cholera* colonization of the infant mouse intestine. *PLoS Pathog*. 2011 Feb;7(2):e1001295.

Dellagostin OA, Grassmann AA, Rizzi C, Schuch RA, Jorge S, Oliveira TL, McBride AJ, Hartwig DD. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 14;18(1):pii.E158.

Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science*. 1996 Jan 19;271(5247):348-50.

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 May 1;125(5):921-46.

Ehrlich P, Morgenroth J. Ueber haemolysin dritte Mitteilung. *Berliner Klinische Wochenschrift*. 1900;37:453.

Elsner J, Oppermann M, Czech W, Kapp A. C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. *Blood*. 1994 Jun 1;83(11):3324-31.

Ember JA, Sanderson SD, Hugli TE, Morgan EL. Induction of interleukin-8 synthesis from monocytes by human C5a anaphylotoxin. *Am J Pathol*. 1994 Feb;144(2):393-403.

Eshghi A, Lourdault K, Murray GL, Bartpho T, Sermswan RW, Picardeau M, Adler B, Snarr B, Zuerner RL, Cameron CE. *Leptospira interrogans* catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence. *Infect Immun*. 2012 Nov;80(11):3892-9.

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

Ezekowitz RA, Gordon S. Interaction and regulation of macrophages receptors. *Ciba Found Symp*. 1986;118:127-36.

Ezekowitz RA, Sim RB, Hill M, Gordon S. Local opsonization by secreted macrophage complement components. Role of receptors for complement in uptake of zymosan. *J Exp Med*. 1984 Jan 1;159(1):244-60.

Ezekowitz RA, Sim RB, MacPherson GG, Gordon S. Interaction of human monocytes, macrophages, and polymorphonuclear leukocytes with zymosan in vitro. Role of type complement receptors and macrophage-derived complement. *J Clin Invest*. 1985 Dec;76(6):2368-76.

Faine S, Adler B, Bolin C, et al. *Leptospira* and leptospirosis (2nd ed). Melbourne: MediSci, 1999.

Faine S, Shahr A, Aronson M. Phagocytosis and its significance in leptospiral infection. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1964 Oct; 42:579-88.

Fang Y, Xu C, Fu XY, Holers VM, Molina H. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J Immunol*. 1998 Jun 1;160(11):5273-9.

Fearon DT, Austen KF, Ruddy S. Formation of a hemolytically active cellular intermediate by the interaction between properdin factors B and D and the activated third component of complement. *J Exp Med*. 1973 Dec 1;138(6):1305-13.

Fischer MB, Ma M, Goerg S, Zhou X, Xia J et al. Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway. *J Immunol*. 1996;157(2):549-56.

Flierman R, Daha MR. The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology*. 2007;212(4-5):363-70.

Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, Jones ML, Johnson KJ, Glosky MM, Eddy SM, Ward PA. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest*. 1994 Sep;94(3):1147-55.

Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol*. 2011 May; 73(5):408-19.

Fraga TR, Courrol Ddos S, Castiblanco-Valencia MM, Hirata IY, Vasconcellos SA, Juliano L, Barbosa AS, Isaac L. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. *J Infect Dis*. 2014 Mar;209(6):876-86.

Fu H, Liu B, Frost JL, Hong S, Jin M, Ostaszewski B, Shankar GM, Costantino IM, Carroll MC. Complement component C3 and complement receptor type 3 contribute to the phagocytosis and clearance of fibrillar A β by microglia. *Glia* 2012 May;60(6):993-1003.

Fukunaga M, Mifuchi I. Unique organization of *Leptospira interrogans* rRNA genes. *J Bacteriol*. 1989 Nov;171(11):5763-1.

Gomes-Solecki M, Santecchia I, Werts C. Animal Models of Leptospirosis: Of Mice and Hamsters. *Front Immunol*. 2017 Feb 21;8:58.

Goris MG, Wagenaar JF, Hartskeerl RA, van Gorp EC, Schuller S, Monahan AM, Nally JE, van der Poll T, van't Veer C. Potent innate immune response to pathogenic *leptospira* in human whole blood. *Plos One*. 2011 Mar 31;6(3):e18279.

Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun*. 2000 Apr;68(4):2276-85.

Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:65-97.

Hagan JE, Moraga P, Costa F, Capian N, Ribeiro GS, Wunder EA Jr, Felzemburgh RD, Reis RB, Nery N, Santana FS, Fraga D, Dos Santos BL, Santos AC, Queiroz A, Tassinari W, Carvalho MS, Reis MG, Diggle PJ, Ko Al. Spatiotemporal Determinants of Urban Leptospirosis Transmission: Four-Year Prospective Cohort Study of Slum Residents in Brazil. *PloS Negl Trop Dis*. 2016 Jan 15;10(1):e0004275.

Hartmann K, Henz BM, Krüger-Krasagakes S, Köhl J, Burger R, Guhl S, Haase I, Lippert U, Zuberbier T. C3a e C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood*. 1997 Apr 15;89(8):2863-70.

Hartung HP, Hadding U. Synthesis of complement by macrophages and modulation of their functions through complement activation. *Springer Semin Immunopathol*. 1983;6(4):283-326.

Hawley KL, Olson CM Jr, Carreras-González A, Navasa N, Anquita J. Serum C3 Enhances Complement Receptor-3 Mediated Phagocytosis of *Borrelia burgdorferi*. *Int J Biol Sci*. 2015 Sep 11;11(11):1269-71.

Helmy KY, Katschke Jr, Gorgani NN, Kljavin NM, Elliott JM, Diehl L, Scales SJ, Ghilardi N, van Lookeren Campagne M. CRlg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell*. 2006 Mar 10;124(5):915-27.

Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, Lambris JD, Warner RL, Flierl MA, Hoesel LM, Gebhard F, Younger JG, Drouin SM, Wetzel RA, Ward PA. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med*. 2006 Jun;12(6):682-7.

Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica). *J Exp Med.* 1916;23:377-402.

Isogai E, Kitagawa H, Isogai H, Kurebayashi Y, Ito N. Phagocytosis as a defense mechanism against infection with leptospiras. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 1986 Feb;261(1):65-74.

Jin D, Ojcius DM, Sun D, Dong H, Luo Y, Mao Y, Yan J. *Leptospira interrogans* induces apoptosis in macrophages via caspase-8 and caspase-3 dependent pathways. *Infect Immun.* 2009 Feb; 77 (2):799-809.

Johnson AR, Hugli TE, Müller-Eberhard HJ. Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a e C5a. *Immunology.* 1975 Jun;28(6):1067-80.

Johnson E, Eskeland T, Bertheussen K. Phagocytosis by human monocytes of particles activating the alternative pathway of complement. *Scand J Immunol.* 1984 Jan;19(1):31-9.

Jost BH, Adler B, Vinh T, Faine S. A monoclonal antibody reacting with a determinant of leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. *J Med Microbiol.* 1986 Nov;22(3):269-75.

Kemper C, Mitchell LM, Zhang L, Hourcade DE. The complement protein properdin binds apoptotic T cells and promotes complement activation and phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jul 1;105(26):9023-8.

Klickstein LB, Barbashov SF, Liu T, Jack RM, Nicholson-Weller A. Complement receptor type 1 (CR1-CD35) is a receptor for C1q. *Immunity.* 1997 Sep;7(3):345-55.

Ko AI, Galvão MR, Ribeiro CMD, Johnson WD, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet Infect Dis.* 1999;354:820-5.

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

Kolev M, Dimeloe S, Le Friec G, Navarini A, Arbore G, Povoleri GA, Fischer M, Belle R, Loeliger J, Develioglu L, Bantug GR, Watson J, Couzi L, Afzali B, Lavender P, Hess C, Kemper C. Complement Regulates Nutrient Influx and Metabolic Reprogramming during TH1 Cell Responses. *Immunity.* 2015 Jun 16;42(6):1033-47.

Korb LC, Ahearn JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol.* 1997 May 15;158(10):4525-8.

Lachmann PJ, Hughes-Jones NC. Initiation of complement activation. *Springer Semin Immunopathol.* 1984;7(2-3):143-62.

Lacroix MB, Aude CA, Arlaud GJ, Colomb MG. Isolation and functional characterization of the proenzyme form of the catalytic domains of human C1r. *Biochem J.* 1989 Feb 1;257(3):885-91.

Lacroix-Lamandé S, d'Andon MF, Michel E, Ratet G, Philpott DJ, Girardin SE, Boneca IG, Vandewalle A, Werts C. Downregulation of the Na/K/ATPase pump by leptospiral

glycoprotein activates the NLRP3 inflammasome. J Immunol. 2012 Mar 15;188(6):2805-14.

Lalli PN, Strainic MG, Yang M, Lin F, Medof ME, Heeger PS. Locally produced C5a binds to T-cell-expressed C5aR to enhance effector T-cell expansion by limiting antigen-induced apoptosis. Blood. 2008 Sep 1;112(5):1759-66.

Lambris JD. The multifunctional role of C3, the third component of complement. Immunol Today. 1988 Dec;9(12):387-93.

Laudisi F, Spreafico R, Evrard M, Hughes TR, Mandriani B, Kandasamy M, Morgan BP, Sivasankar B, Mortellaro A. Cutting edge: the NLRP3 inflammasome links complement-mediated inflammation and IL-1 β release. J Immunol. 2013 Aug 1;19(3):1006-10.

Law SK, Dodds AW. C3, C4 and C5: the thioester site. Biochem Soc Trans. 1990;18:1155-9.

Law SK, Lichtenberg NA, Levine RP. Evidence for an ester linkage between the labile binding site of C3b and receptive surfaces. J Immunol. 1979;123(3):1388-94.

Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. 2001 Apr;14(2):296-326.

Li S, Ojcius DM, Liao S, Li L, Xue F, Dong H, Yan J. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. Innate Immun. 2010. Apr; 16(2):80-92.

Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, Subias M, Pickering MC, Drouet C, Meri S, Arstilla TP, Pekkarinen PT, Ma M, Cope A, Reinheckel T, Rodriguez de Cordoba S, Afzali B, Atkinson JP, Kemper C. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. Immunity. 2013 Dec 12;39(6):1143-57.

Liu Y, Zheng W, Li L, Mao Y, Yan J. Pathogenesis of leptospirosis: interaction of *Leptospira interrogans* with in vitro cultured mammalian cells. Med Microbiol Immunol. 2007 Dec;196(4):233-9.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol. 2004 Dec;25(12):677-86.

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;176:1497-502.

Medicus RG, Götze O, Müller-Eberhard HJ. Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potential of the pathway. J Exp Med. 1976 Oct 1;144(4):1076-93.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.

Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. *Microb Pathog*. 2005 Oct; 39(4):139-47.

Mershon KL, Vasuthasawat A, Lawson GW, Morrison SL, Beenhouwer DO. Role of complement in protection against *Cryptococcus gattii* infection. *Infect Immun*. 2009 Mar;77(3):1061-70.

Morgan BP, Harris CL. Immune-complex solubilization by C in: *Complement Regulatory Proteins*. Academic Press. 1999.

Morley BJ, Walport MJ. *The complement facts book*. London: Academic Press; 2000. 228 p.

Na M, Jarneborn A, Ali A, Welin A, Magnusson M, Stokowska A, Pekna M, Jin T. Deficiency of the Complement Component 3 but not Factor B Aggravates *Staphylococcus aureus* Septic Arthritis in Mice. *Infect Immun*. 2016 Mar 24;84(4):930-9.

Nahori MA, Fournié-Amazouz, Que-Gerwirth NS, Balloy V, Chignard CR, Raetz I, Saint Girons I, Werts C. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lypopolissacaride in murine and human cells. *J Immunol*. 2005 Nov 1;175(9):6022-6031.

Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*.2012. Jun;2(2):103-11.

Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J Microbiol Methods*. 2006 May;65(2):247-57.

Pangburn MK, Rawal N. Structure and function of complement C5 convertase enzymes. *Biochem Soc Trans*. 2002;30 (Pt 6):1006-10.

Pepys MB. Role of complement in induction of antibody production in vivo. Effect of cobra factor and other C3-reactive agents on thymus-dependent and thymus-dependent antibody responses. *J Exp Med*. 1974 Jul 1;140(1):126-45.

Pérez-Flores J, Charruau P, Cedeño-Vázquez R, Atilano D. Evidence for Wild Crocodiles as a Risk for Human Leptospirosis Mexico. *Ecohealth*. 2017 Mar;14(1):58-68.

Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Méd Maladies Infect*. 2013 Jan;43(1):1-9.

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

Pozdnyakova O, Guttormsen HK, Lalani FN, Carroll MC, Kasper DL. Impaired antibody to group B streptococcal type III capsular polysaccharide in C3-and complement receptor 2-deficient mice. *J Immunol*. 2003 Jan 1;170(1):84-90.

Prêtre G, Olivera N, Cédola M, Haase S, Alberdi L, Brihuega B, Gómez RM. Role of inducible nitric oxide synthase in the pathogenesis of experimental leptospirosis. *Microb Pathog*. 2011 Sep;51(3):203-8.

Reis ES, Barbuto JA, Isaac L. Human monocyte-derived dendritic cells are a source of several complement proteins. *Inflamm Res*. 2006 May;55(5):179-84.

Richardson AR, Soliven KC, Castor ME, Barnes PD, Libby SJ, Fang FC. The Base Excision Repair system of *Salmonella enterica* serovar typhimurium counteracts DNA damage by host nitric oxide. *PloS Pathog*. 2009 May;5(5):e1000451.

Ricklin D, Hajishengalis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010 Sep;11(9):785-97.

Rieder H, Ramadori G, Meyer zum Büschenfelde KH. Guinea pig Kupffer cells can be activated in vitro to an enhanced superoxide response. *J Hepatol*. 1988 Dec;7(3):338-44.

Roosendall R, Carroll MC. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol Rev*. 2007 Oct;219: 157-66.

Saito M, Villanueva SY, Kawamura Y, Iida K, Tomida J, Kanemaru T, Kohno E, Miyahara S, Umeda A, Amako K, Gloriani NG, Yoshida S. *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water. *Int J Evol Microbiol*. 2013 Jul;63(Pt 7):2457-62.

Schreier S, Triampo W, Doungchawee G, Triampo D, Chadsuthi S. Leptospirosis research: fast, easy and reliable enumeration of mobile leptospires. *Biol Res*. 2009;42(1):5-12.

Schwaebler W, Dahl MR, Thiel S, Stover C, Jensenius JC. The mannan-binding-lectin-associated serine proteases (MASPs) and Map 19: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. *Immunobiology*. 2002 Sep;205(4-5):455-66.

Shigeoka AO, Jensen CL, Pincus SH, Hill HR. Absolute requirement for complement in monoclonal IgM antibody-mediated protection against experimental infection with type III group B streptococci. *J Infect Dis*. 1984 Jul;150(1):63-70.

Smythe L, Dohnt M, Norris M, Symonds M, Scott J. Review of leptospirosis notifications in Queensland 1985 to 1996. *Commun Dis Intell*. 1997 Jan 23;21(2):17-20.

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

Strainic MG, Liu J, Huang D, An F, Lalli PN, Muqim N, Shapiro VS, Dubyak GR, Heeger PS, Medof ME. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4⁺ T cells. *Immunity*. 2008 May;28(3):425-35.

Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, Tudoran R, Spruce LA, Greenbaum LE, Lambris JD. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med*. 2003 Sep 15;198(6):913-23.

Sung SS, Nelson RS, Silverstein SC. Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages. *J Cell Biol*. 1983 Jan;96(1):160-6.

Takada Y, Ye X, Simon S. The Integrins. *Genome Biology*, 2007;8(5):215.

Taylor AJ, Paris DH, Newton PN. A Systematic Review of the Mortality from Untreated Leptospirosis. *PloS Negl Trop Dis*. 2015 Jun 25;9(6):e0003866.

Thiel S, Vorup-Jenses T, Stover CM, Schwaebler W, Laursen SB, Poulsen K et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*. 1997;386:506-10.

Toma C, Murray GL, Nohara T, Mizuyama M, Koizumi N, Adler B, Suzuki T. Leptospiral outer membrane protein LMB216 is involved in enhancement of phagocytic uptake by macrophages. *Cell Microbiol*. 2014 Sep;16(9):1366-77.

Toma C, Okura N, Takayama C, Suzuki T. Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. *Cell Microbiol*. 2011 Nov;13(11):1783-92.

Turk JL. Evidence for a preferential effect of cyclophosphamide on B-cells. *Proc R Soc Med*. 1973 Aug;66(8):805-8.

Turner MW. The lectin pathway of complement activation. *Res Immunol*. 1996 Feb;147(2):110-5.

Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jun 15;12(7):492-502.

van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol*. 2007 Sep;9(9):2095-102.

Vassalakis JA. O papel do componente C3 do Sistema Complemento na infecção *in vivo* por *Leptospira interrogans*. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Viriyakosol S, Mathias MA, Swancutt MA, Kirkland TN, Vinetz JM. Toll-like receptor 4 against lethal *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to in vivo control of leptospiral burden. *Infect Immun*. 2006 Feb;74(2):887-95.

Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1058-66.

Wang B, Sullivan JA, Sullivan GW, Mandell GL. Role of specific antibody in interaction of leptospires with human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun*. 1984 Dec;3(3):809-13.

Weil A. Ueber einer eigenhuemliche, mit Miltumor, Icterus un Nephritis einhergehende acute Infektionkrankheit. *Deutsch Arch Klin Med*. 1886 39:209.

Werts C. Leptospirosis: a Toll road from B lymphocytes. *Chang Gung Med*. 2010 Nov-Dec;33(6):591-601.

Wessels MR, Butko P, Ma M, Warren HB, Lage AL, Carroll MC. Studies of B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 5;92(25):11490-4.

World Health Organization and International Leptospirosis Society. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003.

Yang CW, Hung CC, Wu MS, Tian YC, Chang CT, Pan MJ, Vanderwalle A. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation of leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney Int* 2006;69:815-22.

Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vanderwalle A, Huang CC. The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Aug;13(8):2037-45.

Zaki SA, Sheng P. Clinical manifestations of dengue and leptospirosis in children in Mumbai: an observational study. *Infection*. 2010 Aug;38(4):285-91.

Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*. 1992 Jul 9;358(6382):167-9.