LEANDRO CARVALHO DANTAS BREDA

**Mecanismos de Evasão do Sistema Complemento por *Leptospira* ssp.:
Interação com o Inibidor de C1 Esterase e C4BP**

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

São Paulo
2014

LEANDRO CARVALHO DANTAS BREDÁ

**Mecanismos de Evasão do Sistema Complemento por *Leptospira* ssp.:
Interação com o Inibidor de C1 Esterase e C4BP**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Isaac

Versão original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Breda, Leandro Carvalho Dantas.

Mecanismos de evasão do sistema complemento por *Leptospira* spp.: Interação com o inibidor de C1 esterase e C4BP / Leandro Carvalho Dantas Breda. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Lourdes Isaac.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Sistema Complemento.

Versão do título para o inglês: Immune evasion mechanisms by *Leptospiras* spp.: interaction with C1 esterase inhibitor and C4b-binding protein.

1. *Leptospira* 2. LigA 3. LigB 4. C4BP 5. C1INH 6. I. Isaac, Lourdes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas III. Título.

ICB/SBIB035/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leandro Carvalho Dantas Breda.

Título da Dissertação: Mecanismos de evasão do sistema complemento por *Leptospira* spp.: Interação com o inibidor de C1 esterase e C4BP.

Orientador(a): Profa. Dra. Lourdes Isaac.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEPSH. 023.12
PMAZ/mcgn

São Paulo 03 de março de 2012.

Prezada Senhora,

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, em reunião realizada em 29.02.12, analisou e aprovou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Mecanismos de evasão do sistema complemento por Leptospira spp: interação com o inibidor de C1 esterase e C4BP "*. A Comissão considerou, ainda, o referido projeto isento uma vez que o soro a ser utilizado não se constituir objeto do estudo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paolo M.A. Zanotto
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.
Profa. Dra. LOURDES ISAAC
Departamento de Imunologia- ICB/USP

**Aos meus pais e à minha noiva
que sempre me apoiaram e
acreditaram em mim.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus, que me proporcionou uma ótima família com muito caráter e dignidade, a qual me ensinou que a educação é a base de todo e qualquer sucesso. Agradeço à Ele pela oportunidade de estudar em ótimas escolas e excelentes universidades. Agradeço aos meus pais, Luis Antônio e Cynthia, que sempre me estimularam e me apoiaram a continuar me aperfeiçoando mesmo após a graduação. Agradeço aos meus irmãos Bruna e Ricardo, por compreenderem o caminho que estou trilhando para meu futuro. Agradeço ao Zé e a Lourdinha pelo apoio nessa etapa de minha vida. Agradeço também a minha noiva, Cristiane, quem está ao meu lado nos últimos 6 anos e meio e representa um papel fundamental nesta dissertação. Agradeço imensamente pelo seu carinho, amizade, compreensão e pelas diversas discussões sobre ciências nesses últimos 2 anos e meio. Você que nunca me deixou desistir, e que muitas vezes acreditou em mim quando eu mesmo não acreditava. Meu profundo agradecimento.

Agradeço à professora Dra. Lourdes Isaac que me proporcionou a oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório e muito me ensinou sobre ciência e sobre trabalho em grupo. Agradeço também pela sua ajuda, seus conselhos e ótimos almoços e momentos de diversão. Agradeço à Dra. Angela Barbosa que muito nos ajudou na parte experimental e que nos forneceu a proteína recombinante LcpA, sem a qual este trabalho não seria realizado. Agradeço ao demais colaboradores: Dra. Anna Blom, Dra Patrícia Abreu, Dr. Silvio Vasconcelos, Ludimila e as técnicas Gisele e Zenaide que tornaram possível a realização deste trabalho. Aos meus colegas de laboratório, José Antônio, Lorena Bavia, Tatiana Fraga, Mônica Castiblanco, Adriana Martinez, Íris Arantes, Karina Ribeira, Alfredo Shagun e Marlene Florido agradeço imensamente por toda a ajuda, experiência compartilhada e pelas diversas discussões e novos projetos criados em uma simples discussão de resultados.

Agradeço aos professores Dr. Claudio Marinho, Dra. Nancy Starobinas e Dra. Danielle Cavalcante que participaram da minha qualificação, aplicando uma visão crítica e construtiva para o melhor desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também ao Cris, Andrea, Zé, Tiago, Matheus e Tércio que me ajudaram na citometria de fluxo, e a todos os doadores de sangue que contribuíram para este trabalho. Gostaria também de mostrar minha gratidão à todos os

funcionários do departamento: Milton, Otacílio, Paula, Jotelma, Amanda, Maria do Carmo, João e a Eni, que tanto me ajudou nas diversas dúvidas e problemas com a burocracia da pós graduação. Agradeço também aos professores Gustavo e Niels pelas diversas conversas e desabafos. Agradeço aos inúmeros amigos e colegas de departamento por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço às agências de fomento, FAPESP e ao CAPES que proporcionaram o desenvolvimento deste trabalho bem como minha formação.

“Para cada pessoa que recebe sem trabalhar, outra pessoa deve trabalhar sem receber”.

(Margaret Thatcher)

RESUMO

Breda LCD. Mecanismos de evasão do sistema complemento por *Leptospira* spp.: Interação com o inibidor de C1 esterase e C4BP. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

O sistema complemento (SC) é composto por mais de 40 proteínas que participam da resposta inflamatória como anafilatoxinas ou como fatores quimiotáticos e da eliminação de patógenos ao gerar opsoninas e o complexo de ataque à membrana. As proteínas reguladoras do SC são necessárias para controlar o consumo excessivo e a ativação desse sistema sobre as células próprias do organismo. Porém, alguns patógenos interagem com estas proteínas reguladoras para escapar do SC e sobreviver em nosso organismo. Patógenos mais bem adaptados e mais virulentos podem exibir melhor estratégia de evasão ao SC, enquanto microorganismos avirulentos podem se mostrar mais susceptíveis à ação do SC. A leptospirose é uma doença causada por bactérias espiroquetas do gênero *Leptospira*. Estudos anteriores demonstram a interação de sorovares patogênicos de leptospira com inibidores do SC, como o Fator H e C4b *binding protein* (C4BP), permitindo assim a sua evasão ao SC. Neste trabalho verificamos que as regiões SCR 7 e SCR 8 das cadeias alfa do C4BP são responsáveis pela interação com as proteínas leptospirais recombinantes LcpA e LigBC, enquanto as regiões SCR 4, SCR 7 e SCR 8 são responsáveis pela interação com a proteína LigAC e com a *L. interrogans* íntegra. Observamos também que a interação entre a molécula de C4BP e proteínas de *L. interrogans* é dependente de forças iônicas e podem ser inibidas na presença de heparina, sugerindo que a ligação deste composto com as proteínas bacterianas LigAC e LigBC deve ocorrer nas proximidades do local onde tais ligantes interagem com a molécula de C4BP. Outro importante regulador da via clássica e das lectinas do SC estudado neste trabalho foi o inibidor de C1 esterase (C1INH). Pela primeira vez, mostramos a interação de C1INH com *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona (atenuada), *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (patogênica) e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica). Verificamos que o C1INH ligado à superfície destas cepas mantém sua atividade reguladora da via clássica do SC. Ensaio de sobrevivência de leptospira na presença de soro deficiente de C1INH sugere que o C1INH tem grande importância para a sobrevivência da *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona, podendo ser utilizado por esta bactéria para escapar da ativação da via clássica e das lectinas do SC.

Palavras-chave: Leptospira. LigA. LigB. C4BP. C1INH.

ABSTRACT

Breda LCD. Immune evasion mechanisms by *Leptospiras* spp.: interaction with C1 esterase inhibitor and C4b-binding protein. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The Complement System (CS) consists of more than 40 proteins that may participate in inflammatory response (as anaphylatoxins or chemotactic factors) or participate in pathogens killing (as opsonic factors or forming the membrane attack). Complement regulatory proteins are necessary to avoid the excessive consumption of these proteins and their activation on self cells. However, some pathogens interact with these regulatory proteins to avoid SC activation surviving in the host. Virulent pathogens may exhibit strategies to evade CS while avirulent pathogens could be more susceptible to SC lysis. Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by spirochetes from the genus *Leptospira*. Previous work showed that pathogenic *Leptospira* is able to interact with complement regulators - such as Factor H and C4b-binding protein (C4BP) to avoid SC. In this work, we demonstrated that short consensus repeat (SCR) 7 and 8 of C4BP alpha chain are responsible to interaction with outer membrane proteins of *L. interrogans* surface LcpA and LigBC while the SCR 4, SCR 7 and SCR 8 are responsible to interaction with protein LigAC and with intact *L. interrogans*. We also studied the binding of C4BP to these recombinant proteins when we observed that this interaction is ionic strength dependent and can be inhibited by the presence of heparin. Here we suggest that heparin is able to bind directly to LigAC and LigBC and in addition this interaction may interfere with the interaction of LigAC and LigBC to C4BP. Another important regulator of classical and lectin pathways studied in this work is C1 esterase inhibitor (C1INH). Here we described the binding of C1INH to the surface of *L. interrogans* sorovar Pomona strain Pomona, *L. interrogans* sorovar Kennewicki strain Pomona Fromm and *L. biflexa* sorovar Patoc strain Patoc I. We observed that the C1INH binding to the membrane of *Leptospira* is still able to regulates the classical pathway. We also performed a killing experiment with C1INH deficient serum when we observed that C1INH is important to the survival of *L. interrogans* sorovar Pomona strain Pomona. These results suggest that *L. interrogans* sorovar Pomona strain Pomona may interact with C1INH to avoid the activation of classical and lectin pathways. To our knowledge this is the first study to report the interaction of C1INH to *Leptospira* spp.

Keywords: *Leptospira*. LigA. LigB. C4BP. C1INH.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa – Aminoácidos

BSA - Albumina de soro bovino

C1INH – inibidor de C1 esterase

C4BP – *C4b-binding protein*

CCP – do inglês Complement control proteins

CUB – do inglês Complement subcomponents

DAF - Fator de aceleração de decaimento

D.O. – Densidade óptica

ECL – do inglês Enhanced Chemiluminescence System

EGF – do inglês Epidermal growth fator

ELISA – do inglês *Enzyme linked immunosorbent assay*

EMJH - *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris*

FD – Fator D

FH - Fator H

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FSC – do inglês Forward scatter (tamanho)

GLP – Glicolipoproteína

HAE – Angioedema hereditário

IL – Interleucina

IM – Membrana interna

LcpA – do inglês *leptospiral complement regulator-acquiring protein*

LigA – do ingles *Leptospiral immunoglobulin-like protein A*

LigAC – Região C-terminal da proteína LigA

LigB – do inglês *Leptospiral immunoglobulin-like protein A*

LigBC – Região C-terminal da proteína LigB

LipL32 – do inglês *Lipoprotein of Leptospira 32*

LPF – *L. interrogans* sorovar Kennewick estirpe Pomona Fromm (patogênica)

LPS - Lipopolissacarídeo

MAC - Complexo de ataque à membrana

MASP – do inglês *mannose associated serine protease*

MAT – Microaglutinação

MBL – do inglês mannose binding lectin

MCP - cofator de proteólise de membrana

MFI – do inglês Mean fluorescence intensity

NaCl – Cloreto de sódio

OM – do inglês *Outer membrane* (parede externa)

Ompl – do inglês *Outer membrane protein of Leptospira spp*

OPD - ortofenil-enodiamina

Patoc – *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não-patogênica)

PBS – Salina tamponada

PBS-T – PBS com 0,05% de Tween

PCR – do inglês *Polimerase chain reaction*

PE – Ficoeritrina

PG – Peptideoglicano

Pomona – *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona (patogênica atenuada)

SC – Sistema complemento

SCR – do inglês short consensus repeat

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

Serpinas – do inglês Serine proteinase inhibitors

SHN – soro humano normal

SI – Sistema imunológico

SP - serino protease

SsBP - do inglês *Ss-Binding Protein*

SSC – do inglês Side scatter (granulosidade)

TLR – do inglês *Toll like receptors*

VC – Via Clássica

WB – do inglês *Western blot*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Leptospira</i> spp. visualizada por microscopia.....	20
Figura 2 - Composição e arquitetura da membrana de leptospiros patogênicas.	23
Figura 3 – Dimensões da <i>Leptospira</i> spp.....	24
Figura 4 - Vias de ativação do Sistema Complemento.....	30
Figura 5 - Estruturas das moléculas de C1q, MBL e de L-Ficolina (Ficolina 2) em complexo com as serino proteases.	31
Figura 6 - Mecanismos de evasão ao Sistema Complemento.	33
Figura 7 – O papel do SC na morte de <i>Leptospira</i> spp.	35
Figura 8 - Organização da proteína C4BP.	37
Figura 9 - Inibição da via clássica e das lectinas do SC por C4BP.	38
Figura 10 - Interação de C4BP com <i>Leptospira</i>	39
Figura 11 - Interação do regulador C4BP com proteínas Ligs e LcpA de <i>L. interrogans</i>	39
Figura 12 – Ilustração esquemática das proteínas LigA e LigB de leptospiros patogênicas.....	40
Figura 13 - Representação da molécula de C1INH e da sua interação com as moléculas de C1s e C1r.	42
Figura 14 - Representação da molécula de C1r e C1s.	43
Figura 15 – Papel do C1INH na ativação do sistema calicreína-cinina.	44
Figura 16 - Mutantes recombinantes de C4BP humano empregados.....	46
Figura 17 - Análise da integridade das diferentes proteínas C4BP recombinantes por <i>Western blot</i>	56
Figura 18 - Sequência dos aminoácidos que compõem a cadeia alfa da C4BP humana.	56
Figura 19 – Utilização da técnica de ELISA para detecção dos diferentes mutantes de C4BP.....	57
Figura 20 - Identificação dos domínios de C4BP responsáveis pela interação com as proteínas LcpA, LigAC e LigBC de leptospiros patogênicas.	58
Figura 21 – Interação das proteínas recombinantes LcpA, LigAC e LigBC com a C4BP na presença de heparina.	60
Figura 22 – Interação das proteínas recombinantes de leptospiros patogênicas LigAC e LigBC e do regulador C4BP com heparina.....	61

Figura 23 - Ligação de C4BP com as proteínas de membrana de leptospi- ras patogênicas LcpA, LigAC e LigBC sob diferentes concentrações de NaCl.	62
Figura 24 - População de <i>Leptospira</i> spp. visualizada por citometria de fluxo de acordo com seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC).	64
Figura 25 - Interação do regulador C4BP com leptospira patogênica.	65
Figura 26 – Interação do C1INH com a superfície de <i>Leptospira</i> spp.	67
Figura 27 - Quantificação da proteína C1INH ligada à membrana das diferentes cepas de leptospira	68
Figura 28 - C1INH ligado à membrana de <i>Leptospira</i> mantém sua capacidade de interagir com a proteína C1s do SC.	69
Figura 29 - Análise da deposição de C1q e fragmentos da proteína C4 em <i>Leptospira</i> spp.	71
Figura 30 - Análise da deposição de C1q e fragmentos da proteína C4 como marcadores de ativação da via clássica do SC.	72
Figura 31 - Ensaio de sobrevivência de <i>Leptospira</i> spp. na presença de SHN e soro humano depletado de FB.	74
Figura 32 - Correlação da sobrevida de leptospi- ras patogênicas, não patogênicas e atenuadas na presença de SHN ou soro humano depletado de FB.	75
Figura 33 – Ensaio de sobrevivência de <i>Leptospira</i> spp. na presença de SHN e soro humano deficiente de C1INH (HAE).	76
Figura 34 – Sobrevida de leptospi- ras não patogênica e atenuada na presença de soro humano deficiente de C1INH após reconstituição dos níveis séricos de C1INH.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Casos de leptospirose notificados ao Ministério da Saúde em todo o Brasil e no Estado de São Paulo entre os anos 2007 e 2013.	22
Tabela 2 - Principais reguladores solúveis do SC.....	32
Tabela 3 - Principais reguladores de membrana do SC.....	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Leptospirose.....	19
1.2	Leptospira.....	22
1.3	Sistema Imune e <i>Leptospira</i>	24
1.3.1	Sistema Complemento	25
1.3.1.1	Via Clássica.....	27
1.3.1.2	Via Alternativa	27
1.3.1.3	Via das Lectinas.....	28
1.3.1.4	Via Terminal comum.....	29
1.3.1.5	Reguladores do SC.....	31
1.3.1.5.1	C4b Binding Protein – C4BP	36
1.3.1.5.2	Interação entre C4BP e proteínas de membrana de leptospiras patogênicas	40
1.3.1.5.3	Inibidor de C1 esterase	41
2	OBJETIVO	45
2.1	Objetivos Gerais.....	45
2.2	Objetivos Específicos	45
3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1	Sorovares de <i>Leptospira</i> e condições de cultivo	48
4.2	Obtenção de soro humano normal	48
4.3	Obtenção de proteínas recombinantes de leptospiras patogênicas.....	48
4.4	Interação entre proteínas de leptospiras patogênicas – LcpA, LigAC e LigBC - com os diferentes mutantes de C4BP	49
4.5	Interação entre as proteínas LcpA, LigAC e LigBC com heparina ou com C4BP na presença de NaCl e heparina	50
4.6	Padronização dos ensaios de citometria de fluxo para verificar ativação da via clássica e interação dos reguladores do SC com <i>Leptospira</i> spp	51
4.7	Análise da interação dos diferentes mutantes de C4BP com leptospira patogênica	52

4.8	Interação de leptospiros com inibidor de C1 esterase ou com complexo C1 e análise da função reguladora do C1INH.....	52
4.9	Avaliação da sobrevivência de leptospira na presença do SC	54
4.10	Análise estatística	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Identificação dos domínios SCRs de C4BP responsáveis pela interação com as proteínas LcpA, LigAC e LigBC de leptospiros patogênicos	55
5.2	Interação entre as proteínas LcpA, LigAC e LigBC de leptospiros patogênicos e C4BP em diferentes concentrações de NaCl	61
5.3	Padronização dos ensaios de citometria de fluxo utilizando <i>Leptospira</i> spp.....	62
5.4	Análise da interação entre a leptospira patogênica e os diferentes mutantes de C4BP por citometria de fluxo	65
5.5	Inibidor de C1 esterase interage com superfície de diferentes espécies de <i>Leptospira</i>	66
5.6	Inibidor de C1 esterase ligado à <i>Leptospira</i> mantém sua função reguladora da via clássica do SC	68
5.7	Ativação da via clássica do SC por leptospiros, independente de anticorpos específicos	70
5.8	Sobrevivência de leptospira na presença de SHN e soro depletado de Fator B.....	73
6	DISCUSSÃO.....	78
7	CONCLUSÃO.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* (Levett, 2001) (**Figura 1A**), sendo os roedores os principais hospedeiros desta bactéria. A primeira descrição da doença foi relatada por Weil em 1886 e, desta forma, recebeu o nome de doença de Weil (Woodward, 2001). Entre os anos de 1914 e 1915, os pesquisadores Inada e Ido publicaram diversos trabalhos de extrema relevância para a pesquisa científica na área desta doença (Kobayashi, 2001). Em janeiro de 1915 eles a descoberta do agente causador desta doença, o qual nomearam de *Spirochaeta icterohaemorrhagica japonica* nov. sp. Estes autores utilizaram amostras de sangue de 17 soldados com sintomas da doença de Weil para infectar cobaias quando verificaram a presença de grande número de leptospiplas no fígado, nos rins e no sangue e pequenas quantidades dessas bactérias no baço e medula óssea desses animais (Inada et al., 1916). Neste mesmo trabalho, os pesquisadores coletaram amostras de urina de trabalhadores com doença de Weil quando observaram a presença de um grande número de bactérias vivas após 13 a 15 dias de infecção (**Figura 1B**).

Com o avanço dos estudos, diversas modificações foram feitas na classificação da *Spirochaeta icterohaemorrhagica japonica* nov. sp descoberta pelo grupo do Dr. Inada. Em 1918, Noguchi sugeriu a criação de um novo gênero, *Leptospira*, na ordem *Spirochaetales* e, assim, renomearam a *Spirochaeta icterohaemorrhagica japonica* nov. sp para *Leptospira icterohaemorrhagica* (Kobayashi, 2001). Devido à semelhança da leptospira com o ponto de interrogação, sua nomenclatura foi modificada para *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* (Levett, 2001), nomenclatura utilizada até hoje na classificação das leptospiplas.

Figura 1 - *Leptospira* spp. visualizada por microscopia.

(a) *Leptospira* observada por microscopia eletrônica (esquerda - Instituto Pasteur, 2007) ou por microscopia de campo escuro em nosso laboratório – aumento de 40x (direita). (b) Por microscopia de campo escuro, a presença de leptospiros foi observada em túbulos renais (esquerda) e em urina de pacientes infectados (direita) (Inada et al., 1916).

Com o avanço dos estudos, verificou-se que a transmissão da doença ocorre, principalmente, pelo contato direto de mucosas ou pele lesionada com leptospiros presentes na urina de animais infectados, água ou solos contaminados (Faine et al., 1999). Uma vez eliminada pela urina no meio ambiente, a leptospira pode sobreviver por vários dias até infectar outro animal ou até mesmo seres humanos. Esta sobrevivência depende, além da espécie e cepa estudada, de diversos fatores ambientais. De modo geral, as condições ideais para a sobrevivência desta bactéria são: temperaturas elevadas, alta umidade e pH próximo da neutralidade (Michna et al., 1970), características climáticas típicas de países tropicais que, juntamente com a falta de saneamento básico e grandes áreas com risco de alagamento, contribuem para a alta prevalência de leptospirose nestes países. Em 2004, Khairani-Bejo e

colaboradores estudaram a interferência das condições ambientais da Malásia na sobrevivência da *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo. As condições ideais para a sobrevivência desta cepa são: temperatura de 27 °C e pH ótimo da água corrente entre 6,7 e 7,5. Em água encanada a leptospira pode sobreviver até 30 dias, mas na presença de cloro a sobrevivência é de apenas 5 dias. Em solo, a sobrevivência desta cepa pode chegar a 6 dias. Na década de 50, Krischner e Maguire (1957) verificaram que a sobrevivência da *Leptospira interrogans* sorovar Pomona liberada pela urina de bovinos e presente em água de chuva era de aproximadamente 3 semanas, porém, quando em águas oceânicas, a sobrevivência da leptospira é de apenas 24 horas (Michna et al., 1970).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, mais de quinhentos mil casos de leptospirose são reportados por ano em todo o mundo (McBride et al., 2005; World Health Organization, 1997). As manifestações clínicas da leptospirose podem ser divididas em duas fases: Fase inicial ou benigna e Fase tardia ou Síndrome de Weil. As manifestações clínicas na fase aguda são caracterizadas por febre, vômitos, dor de cabeça e mialgia – principalmente nas panturrilhas. Esta fase dura entre 3 e 7 dias e 90% dos pacientes não apresentam nenhum sintoma após este período. Como muitos dos sintomas dessa fase inicial são comuns a várias doenças infecciosas, o número de pacientes com leptospirose é subestimado. Aproximadamente 10% dos pacientes podem desenvolver a Síndrome de Weil, caracterizada por icterícia, hemorragia pulmonar e insuficiência renal aguda (Andrade et al., 2008). A fase tardia da leptospirose pode durar de 4 a 30 dias. Os principais exames laboratoriais utilizados para confirmar o diagnóstico de leptospirose são: na fase aguda da doença - reação em cadeia empregando DNA polimerase (PCR) e cultura de sangue em meio *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris* (EMJH). Na fase tardia da doença – cultura de urina e testes sorológicos como ELISA para detecção de IgM específica à leptospira e teste de microaglutinação (MAT – do inglês *microagglutination test*) (Brasil, 2009 - Leptospirose: diagnóstico e manejo). Segundo dados do Ministério da Saúde foram diagnosticados 2.001 casos de leptospirose em todo o Brasil em 2013 (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Casos de leptospirose notificados ao Ministério da Saúde em todo o Brasil e no Estado de São Paulo entre os anos 2007 e 2013.

Ano	Número de casos no Brasil	Estado de São Paulo
2013	2.001	524
2012	3.238	779
2011	4.947	974
2010	3.491	802
2009	3.852	822
2008	3.515	584
2007	3.319	757

Dados retirados do DATASUS no site do Ministério da Saúde:
<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lepto/bases/leptobrnet.def>

Embora ocorra alta incidência desta doença, principalmente em países em desenvolvimento e com clima tropical, especialmente em populações com saneamento básico inadequado e em regiões sujeitas a enchentes (Reis et al., 2008), estudos atuais mostram que países desenvolvidos também apresentam casos de leptospirose, porém a transmissão ocorre por exposição ocupacional em trabalhadores rurais ou pela prática de esportes aquáticos (Benschop et al., 2009; Desai et al., 2009).

1.2 Leptospira

Até o momento, foram descritos 19 espécies (13 patogênicas e 6 saprófitas) e mais de 260 sorovares patogênicos e 60 sorovares não patogênicos (Adler et al., 2010; Bharti, 2003; Brenner et al., 1999). Os sorovares são classificados de acordo com a heterogeneidade estrutural dos carboidratos do lipopolissacarídeo (LPS) (World Health Organization, 2003) e são de grande importância epidemiológica (Brenner et al., 1999). Semelhante a outras espiroquetas, a leptospira apresenta características tanto de bactérias Gram-positivas como de Gram-negativas. A dupla-membrana externa, responsável pela forma helicoidal, é formada por peptidoglicanos, proteínas, lipídeos, lipoproteínas e LPS que conferem características de Gram-negativas (Cullen et al., 2002). O LPS é o componente mais abundante dessa membrana e contribui para a patogenicidade desta doença (Vinh

et al., 1986), embora ele apresente menor toxicidade, quando comparada à de outras bactérias Gram-negativas. A membrana citoplasmática da leptospira apresenta arquitetura e composição semelhantes ao observado em bactérias Gram-positivas, principalmente pela íntima associação com as cadeias de peptidoglicanos (Haake, 2000) (**Figura 2**).

A leptospira pertence à ordem *Spirochaeta* e mede, aproximadamente, 0,1 μm de diâmetro e seu tamanho varia entre 6 μm e 20 μm , mas, ocasionalmente, podemos encontrar leptospiros maiores. A amplitude helicoidal varia entre 0,1 μm a 0,15 μm , sendo o comprimento da onda de aproximadamente 0,5 μm (**Figura 3**) (Schreier et al., 2009). A leptospira é uma bactéria aeróbica obrigatória e seu crescimento ótimo ocorre entre 28 °C a 30 °C. O meio mais utilizado para seu cultivo é o EMJH, suplementado com albumina de soro bovino (BSA) e o seu crescimento leva em torno de 7 a 14 dias (Levett, 2001).

Figura 2 - Composição e arquitetura da membrana de leptospiros patogênicos.

A membrana interna (IM) de *L. interrogans* está intimamente associada à camada de peptidoglicanos (PG), que confere características de bactérias Gram-positivas à *Leptospira*. A parede externa (outer membrane - OM) é composta por diferentes proteínas como a *leptospiral immunoglobulin-like (Lig) protein A* ou *protein B* (LigB), *leptospiral complement regulator-acquiring protein A* (LcpA), lipoproteína de *Leptospira* (LipL32), Loa 22 e *outer membrane protein of Leptospira* spp. (Ompl 1) e grande quantidade de lipopolissacarídeos (LPS), que fornecem características de bactérias Gram-negativas à *Leptospira* (Fraga et al., 2014).

Figura 3 – Dimensões da *Leptospira* spp.

Esta figura apresenta as dimensões médias da leptospira: 6 a 20 µm de extensão, 0,1 a 0,2 µm de diâmetro com amplitude helicoidal variando entre 0,1 e 0,15 µm e comprimento de onda de aproximadamente 0,5 µm (adaptado de Schreier et al., 2009).

A leptospira é um patógeno de vida extracelular e, portanto, os principais mecanismos imunes efetores contra este patógeno são dependentes de anticorpos, fagocitose e ativação do Sistema Complemento (SC) (Meri *et al.*, 2005; Murgia et al., 2002; Wang *et al.* 1984).

1.3 Sistema Imune e *Leptospira*

O sistema imunológico tem como principal função o reconhecimento e eliminação de antígenos não-próprios e pode ser, didaticamente, dividido em: sistema imune inato - composto principalmente por células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e SC - e sistema imune adquirido – composto principalmente por linfócitos T e B e seus produtos (Abbas, Lichtman, 2000). Ao longo dos anos, diversos grupos de pesquisas ao redor do mundo têm estudado a resposta imune à leptospira. Em 1984, Wang e colaboradores verificaram a capacidade de neutrófilos e macrófagos de fagocitar leptospiros, tanto patogênicas quanto não patogênicas. As leptospiros não patogênicas podem ser fagocitadas opsonizadas, ou não, por IgG, enquanto as leptospiros patogênicas só sofrem fagocitose quando opsonizadas (Wang et al., 1984). Os mecanismos utilizados por essas células para eliminar a leptospira fagocitada podem ser dependentes (H_2O_2) ou independentes (grânulos primários) de espécies reativas de oxigênio (Murgia et al., 2002).

A eliminação de leptospiros também depende da família dos receptores semelhante a Toll (TLR), presentes em células do sistema imune inato. Embora seja bem descrito na literatura que o LPS é reconhecido pelo TLR 4 e pelo receptor CD14, em 2001 Werts e colaboradores verificaram que o LPS presente na

membrana de leptospira é capaz de ativar células humanas por meio do seu reconhecimento pelos receptores TLR 2 e CD14 (Werts et al., 2001). Recentemente, Lacroix-Lamandé e colaboradores (2012) demonstraram que os receptores da TLR2, TLR4 e os receptores da família semelhante aos receptores Nod contendo 3 domínios de pirina (NLRP3) de macrófagos são capazes de reconhecer glicolipoproteína e LPS presentes na membrana de leptospira e, assim, induzir a produção de Interleucina (IL) 1 β , importante citocina pró-inflamatória. Além da importância da fagocitose e dos TLRs para eliminação da leptospira, em 2005 Meri e colaboradores observaram que o SC também exerce um importante papel *in vitro* no combate à leptospira.

1.3.1 Sistema Complemento

No final do século XIX os pesquisadores Bordet, Ehrlich e Nuttall propuseram a existência de um componente no soro humano sensível à temperatura e que complementaria a ação das imunoglobulinas frente às infecções bacterianas (Bordet, 1895, 1898; Ehrlich, Morgenroth, 1899; Nuttall, 1888). Sabe-se hoje que o SC, assim denominado por Ehrlich, é composto por aproximadamente 40 proteínas solúveis presentes no plasma e tecidos ou presentes na membrana plasmática de vários tipos celulares. Primeiramente classificado como participante da imunidade inata, o SC é responsável pela eliminação de patógenos por meio da opsonização de partículas, fagocitose e formação do complexo de ataque à membrana “MAC” – do inglês *membrane attack complex*. (Morgan, Harris, 1999). O SC também participa da resposta inflamatória, por meio das anafilatoxinas C3a e C5a; produção de fatores quimiotáticos e solubilização de imunocomplexos circulantes (Sim, 1992; Volanakis, 1998). Na década de 70, pesquisadores sugeriram a interação do sistema imune inato e adquirido e, dessa forma, verificaram a importância do SC na modulação da reposta dos linfócitos T e B da imunidade adquirida (Dunkelberger, Song, 2010).

Embora a lise celular causada pela formação do MAC seja a função mais lembrada do SC, as funções adicionais deste sistema também são bastante relevantes. Os fragmentos C3b, iC3b e C4b são importantes opsoninas que facilitam a fagocitose e destruição de diversos patógenos. Estes fragmentos também auxiliam na retirada de imunocomplexos circulantes pelo baço e fígado, por meio de sua ligação com o receptor de complemento (CR) 1 ou CD35 encontrado,

principalmente, em células sanguíneas (Ehrnthaller et al., 2011). Outra função importante do SC é induzir reações anafilactóides por meio dos fragmentos C3a, C4a e, principalmente, C5a. Essas moléculas são capazes de induzir a migração de fagócitos, relaxamento da musculatura lisa dos vasos e desgranulação de mastócitos, entre outras funções (Marder et al., 1985). As principais substâncias liberadas pelos mastócitos são histamina, leucotrienos e prostaglandinas, responsáveis pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, facilitando assim, a migração de leucócitos e eliminação do patógeno (Schumacher et al., 1991).

O papel do SC na modulação da resposta imune adaptativa começou a ser melhor estudado em 1974, quando se verificou que animais que tiveram o SC depletado pelo tratamento com *cobra venom factor* apresentaram uma menor produção de anticorpos (Pepys, 1974, 1975). Com o desenvolvimento de animais deficientes de proteínas do SC, foi possível verificar que os fragmentos de C3 - C3d/C3dg - ao se ligarem ao receptor CR2 (CD21) de linfócitos B, diminuía de 1.000 a 10.000 vezes o limiar de ativação destas células, facilitando a produção de anticorpos específicos e diferenciação em linfócitos B de memória. Desse modo, o SC também pode atuar como adjuvante, auxiliando a resposta imune adaptativa (Dempsey et al., 1996; Kolev et al., 2013). O SC também pode modular a resposta dos linfócitos T de forma direta ou indireta. Indiretamente, o fragmento C5a pode agir sobre células apresentadoras de antígenos, ajudando na maturação e na expressão de CCR7, facilitando a migração destas células para os órgãos linfóides secundários (Soruri et al., 2003)e, de forma direta, as proteínas de membrana CD46 (MCP – do inglês *membrane cofactor protein*), juntamente com a CD3 e IL 2 são importante na diferenciação dessas células para a subpopulação de linfócitos T reguladores (Kemper et al., 2003)

A síntese de proteínas do SC ocorre, principalmente, no fígado, porém, células como macrófagos, fibroblastos e células dendríticas podem sintetizá-las localmente em diversos tecidos (Prodinger, 1999; Reis et al., 2007; Walport, 2001;). A ativação do SC ocorre de forma sequencial, por três vias principais de ativação: clássica, alternativa e das lectinas.

1.3.1.1 Via Clássica

A primeira via de ativação do SC a ser proposta foi a via clássica, inicialmente descrita como dependente dos íons Ca^{++} e Mg^{++} e da formação de imunocomplexos, formados por anticorpos das classes IgM e IgG. Ao ligar-se ao antígeno, estes anticorpos sofrem um rearranjo em sua porção Fc, que permite sua ligação com a proteína C1q – uma subunidade do complexo C1, formado por duas subunidades de C1r e C1s, e dependente de Ca^{++} (James, 1997; Reid, 1998). A IgG liga-se ao C1q por meio dos domínios CH_2 , enquanto a IgM se liga ao C1q pelos domínios CH_3 . Essa interação leva a uma alteração conformacional na estrutura da molécula de C1q permitindo a ativação da molécula de C1r que, por sua vez, ativará C1s. Na sequência, ocorre a ativação do C4 pelo C1s gerando os fragmentos C4a e C4b. O fragmento C4a pode atuar como anafilatoxina, enquanto o fragmento C4b pode se ligar covalentemente à membrana do patógeno e se ligar ao C2, o qual sofrerá então proteólise pelo C1s e se fragmentará em C2a e C2b. A molécula de C2a ligada ao C4b forma a C3-convertase da via clássica (C4b2a). A C3-convertase é capaz de clivar C3 em C3a e C3b o qual, por sua vez, poderá se ligar à C3-convertase e formar agora a C5-convertase da via clássica C4b2a3b ou poderá atuar como opsonina, facilitando a fagocitose (Barrington et al., 2001; Gewurz et al., 1996). A C5-convertase atua sobre a proteína C5, clivando-a em fragmentos C5a e C5b. O C5b pode se ligar ao C6 e iniciar a via efetora comum da cascata do SC, igual para as três vias, culminando na formação do MAC (Gasque, 2004; Thurman, Holers, 2006) (**Figura 4**). Embora a via clássica tenha sido descrita como dependente da formação de imunocomplexos, sabe-se hoje que há maneiras de iniciar a ativação desta via independentes de anticorpos como, por exemplo, a proteína C reativa, células necróticas e apoptóticas (Ehrnthaller et al., 2011) e certas proteínas encontradas na superfície de patógenos. Estes iniciadores podem interagir diretamente com a molécula de C1, modificando sua estrutura e levando à auto-ativação das subunidades C1r e C1s (Albertí et al., 1996).

1.3.1.2 Via Alternativa

A ativação da via alternativa ocorre constantemente em situações fisiológicas, quando o C3 sofre hidrólise espontânea da ligação tiol-éster presente na sua cadeia

alfa, formando $C3(H_2O)$, que se assemelha estruturalmente à molécula de $C3b$. O $C3(H_2O)$ apresenta sítio ativo para a ligação do Fator B (FB) gerando $C3(H_2O)B$. Nesta condição, o Fator D (FD) atua sobre o Fator B, clivando-o em Ba e Bb. O fragmento Bb se mantém ligado ao $C3(H_2O)$ formando a primeira C3-convertase da via alternativa, a $C3(H_2O)Bb$. Esta C3-convertase, na presença do íon Mg^{++} , cliva $C3$, gerando os fragmentos $C3a$ e $C3b$. O fragmento de $C3b$ pode ligar-se à superfície das células e de microrganismos. Quando a deposição deste fragmento ocorre sobre as células próprias do organismo, ele pode sofrer ação de proteínas reguladoras solúveis (por exemplo, Fator H - FH) ou de membrana (proteína cofator de membrana - MCP) que são cofatores de Fator I (FI). FI é uma enzima que inativará rapidamente o fragmento $C3b$ em $iC3b$. Na presença de microrganismos, o $C3b$ se liga covalentemente à sua superfície e na presença de FB e FD, é capaz de formar mais C3-convertases ($C3bBb$) – caracterizando uma “alça de amplificação”- (Barrington et al., 2001; Gasque, 2004; Harboe, Mollnes, 2008; Thurman, Holers, 2006). A properdina (FP), único regulador positivo do SC, interage com C3-convertase recém-formada, conferindo a estabilidade deste complexo e, portanto, aumentando sua meia-vida. A ligação de fragmentos $C3b$ ao $C3bBb$ forma a C5-convertase - $C3bBb3b$ - que cliva $C5$ em $C5a$ e $C5b$ e inicia a via efetora comum até a formação do MAC (Ehrnthaller et al., 2011) (**Figura 4**).

1.3.1.3 Via das Lectinas

Esta é a via de ativação do SC descrita mais recentemente e, portanto, a menos estudada até o momento. Ela pode ser ativada a partir da ligação de lectinas com açúcares, como a manose, presentes na superfície celular dos antígenos. A lectina mais conhecida é a “*mannose binding lectin*” (MBL) cuja estrutura assemelha-se à do $C1q$ (**Figura 5**). A MBL pode ser encontrada complexada com as *mannose associated serine proteases* (MASP 1, 2 e 3). Estas proteases assemelham-se estruturalmente às subunidades $C1r$ e $C1s$. Uma vez ativada, a MASP-2 clivará $C4$ e $C2$ de forma semelhante ao observado na via clássica pelo $C1s$, formando a C3-convertase ($C4b2a$). Na sequência, o $C3b$ se liga à $C4b2a$ formando a C5-convertase ($C4b2a3b$) que iniciará a via comum final do SC culminando com a formação do MAC (**Figura 4**). Outras moléculas capazes de ativar a via das lectinas do SC são as ficolinas. Estas moléculas apresentam domínios semelhantes ao

colágeno e ao fibrinogênio e, até o momento, foram descritas 3 diferentes ficolinas: Ficolina-1 (ou M-Ficolina), Ficolina-2 (ou L-Ficolina) e Ficolina 3 (ou H-Ficolina). Elas formam complexos ativos com as MASPs e apresentam estruturas semelhantes ao complexo C1 e a MBL (**Figura 5**). Uma vez que as ficolinas interagem com padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, do inglês pathogen-associated molecular patterns), as MASPs são ativadas clivando as moléculas de C4 e C2 e iniciando a ativação da via das lectinas do SC (Hein et al., 2010; Matsushita et al., 2000; Matsushita, Fujita, 2001).

1.3.1.4 Via Terminal comum

A C5-convertase atua sobre as moléculas de C5, clivando-as em C5a e C5b. A formação do C5b inicia a formação do MAC e, diferentemente do descrito até agora, a fase final não mais requer clivagem proteolítica por enzimas. O C5b se liga à C6 e este complexo, posteriormente, liga-se a C7 e nessa etapa ocorre uma mudança conformacional que proporciona uma ligação estável deste complexo com grupos lipofílicos, facilitando sua ligação na membrana plasmática. A proteína C8 também apresenta grupos lipofílicos, que permitem a interação dela com o complexo C5b67 presente na membrana. Por último, ocorre a ligação de 10 a 16 moléculas de C9 ao C5b67, formando uma estrutura cilíndrica estável de aproximadamente 100 Å denominada MAC. Este complexo cria um desequilíbrio osmótico entre a célula e o meio externo, através do influxo de Ca^{++} e, consequentemente, ocorre entrada de água e pequenas moléculas levando à lise celular (**Figura 4**) (Dalmasso, 1989; Walport, 2001).

Figura 4 - Vias de ativação do Sistema Complemento.

A ativação da via clássica é geralmente dependente de anticorpos, enquanto a via das lectinas ativa-se a partir da ligação de lectinas, como a MBL, à superfície do patógeno. As serino proteases do complexo C1 e MBL clivam C4 e C2 para formar a C3-convertase (C4b2a). Na via alternativa temos a interação de C3b com Fator B que sofre proteólise pelo Fator D formando C3bBb (C3-convertase) que é estabilizada pela properdina. A C3-convertase das três vias atua na proteólise de C3, formando C5-convertase (C4b2a3b nas vias clássica e das lectinas e C3bBb3b na via alternativa). A C5-convertase cliva C5 em C5a e C5b que irá interagir com C6, C7, C8 e C9 e formará o complexo de ataque à membrana (Walport, 2001).

Figura 5 - Estruturas das moléculas de C1q, MBL e de L-Ficolina (Ficolina 2) em complexo com as serino proteases.

A molécula de C1q é responsável pela ativação da via clássica do complemento, enquanto a MBL e a ficolina ativam a via das lectinas. As MASPs apresentam estrutura e papel semelhante a C1r e C1s na formação de C3-convertase, pois também atuam na clivagem de C4 e C2 (Ehrnthaller et al., 2011).

1.3.1.5 Reguladores do SC

As proteínas reguladoras do SC são necessárias para que não haja excessiva ativação desse sistema sobre as células próprias, produzindo inflamação e lesão tecidual (Mandal, Ayyagari, 2006), e consumo desnecessário de seus componentes. Sob condições fisiológicas, nosso organismo produz proteínas reguladoras para inibir ou inativar pontos específicos da amplificação enzimática da cascata, assegurando a proteção do indivíduo contra a auto-agressão e garantindo que a ativação do SC seja proporcional à concentração e à duração da presença dos ativadores deste sistema (Hepburn et al., 2008). Os reguladores podem ser divididos em solúveis ou de membrana, como especificado nas **Tabelas 2 e 3**.

Tabela 2 - Principais reguladores solúveis do SC.

<u>Reguladores Solúveis</u>	<u>Ligante</u>	<u>Via Regulada</u>
Fator H	C3b e Fator I	Via Alternativa
Properdina	C3bBb (C3-convertase)	Via Alternativa
<i>C4b-binding protein</i>	C4b	Via Clássica e das Lectinas
Inibidor de C1 esterase	C1r, C1s e MASP 1 e 2	Via Clássica e das Lectinas
Clusterina	C7, C8, C9 e MAC	Via Terminal
Vitronectina	C5b-7 e MAC	Via Terminal
Fator I	C4b, C3b e C3d, Fator H, C4BP, MCP, CR1	Via Alternativa, Clássica e das Lectinas

Tabela 3 - Principais reguladores de membrana do SC.

<u>Reguladores de Membrana</u>	<u>Ligante</u>	<u>Via Regulada</u>
CD35 (CR1)	C3b, C4b e Fator I	Via Alternativa, Clássica e das Lectinas
CD46 (MCP)	C3b, C4b e Fator I	Via Alternativa, Clássica e das Lectinas
CD55 (DAF)	C3b, C4b, C3bBb e C4b2a (C3-convertase)	Via Alternativa, Clássica e das Lectinas
CD59	C5b-8	Via Alternativa, Clássica e das Lectinas

Embora essas proteínas reguladoras sejam essenciais para que não haja destruição de células próprias pelo SC, os patógenos podem apresentar sofisticadas estratégias de evasão ao SC e utilizar da interação com essas proteínas reguladoras do hospedeiro para evadir o sistema imune e sobreviver em nosso organismo. (Figura 6).

Figura 6 - Mecanismos de evasão ao Sistema Complemento.

Micro-organismos possuem diversas estratégias de evasão ao sistema complemento (SC). A inibição da via clássica (VC) e da via das lectinas pode ocorrer pelo recrutamento dos reguladores inibidor de C1 esterase (C1-INH) e C4b-binding protein (C4BP) por moléculas de superfície dos patógenos. Mimetismo de reguladores e clivagem de proteínas do SC também são importantes mecanismos de evasão utilizadas pelos patógenos (Lambris et al., 2008).

Diversos trabalhos mostram os mecanismos utilizados por inúmeras bactérias para evadir o SC. A *Borrelia burgdorferi* e o *Streptococcus pyogenes* são capazes de interagir com os reguladores FH e FH-like 1 (FHL-1) e, assim, evadir a via alternativa do SC (Kraiczy et al., 2002; Pandiripally et al., 2002). Em 2004, Lathem e colaboradores verificaram que a *Escherichia coli* O157:H7 é capaz de secretar a metaloprotease StcE, responsável pela clivagem do C1INH. Uma vez clivado por esta enzima, o C1INH regula a ativação melhor do que C1INH intacto e, portanto, a *E. coli* utiliza deste mecanismo para evadir às vias clássica e das lectinas do SC (Lathem et al., 2004). Recentemente, nosso grupo mostrou que leptospiros patogênicas podem secretar proteases capazes de clivar proteínas do SC e, portanto, diminuir a ativação deste sistema (Fraga et al., 2013) porém, pouco se conhece a respeito dos mecanismos de evasão imune apresentados por leptospiros. Em 2005, Meri e colaboradores verificaram a ativação do SC sobre *Leptospira* e observaram a interação de *L. interrogans* (cepa patogênica) com o regulador FH que, associado ao C3b (recém-formado na superfície do patógeno) atua como co-fator do FI, capaz de clivar C3b e inativá-lo, bloqueando, portanto, a ativação da via

alternativa do SC. Em 2009 nosso grupo também constatou que as espécies patogênicas de *Leptospira* (*L. interrogans*) e as espécies saprófitas (*L. biflexa* - Patoc) diferem pela suscetibilidade à atividade bactericida do SC, pois a deposição do complexo de ataque à membrana (MAC) ocorre principalmente na superfície da estirpe não patogênica - Patoc (Barbosa et al., 2009) (**Figura 7A**). Utilizando soro deficiente na ativação da via clássica e das lectinas, verificamos que a *L. biflexa* (não patogênica – Patoc) é susceptível à lise pelo SC mesmo na presença apenas da via alternativa funcional, enquanto a *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona (atenuada) sobrevive (95%) na presença destes soros, sugerindo que a via clássica é a responsável pela eliminação parcial da leptospira estirpe Pomona - atenuada (**Figura 7B**).

Figura 7 – O papel do SC na morte de *Leptospira* spp.

A *L. biflexa* é susceptível à lise pelo SC na presença de SHN, soro deficiente de MBL ou soro deficiente de C1s. A *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona é parcialmente susceptível à lise pelo SC na presença de SHN e soro humano deficiente de MBL, mas totalmente resistente em soro humano deficiente de C1s. A *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm é resistente à lise pelo SC (Barbosa et al., 2009).

Por outro lado, as leptospiros virulentas são capazes de interagir com proteínas reguladoras do hospedeiro, como FH e *C4b-binding protein* (C4BP), e conseguem sobreviver à lise pelo SC (Barbosa et al., 2010 e Castiblanco-Valencia et al. 2012; Meri et al, 2005).

1.3.1.5.1 *C4b Binding Protein – C4BP*

Em 1977, Ferreira e colaboradores identificaram uma proteína presente no soro de camundongos com capacidade de interagir com a proteína Ss do SC denominando-a *Ss-Binding Protein* (SsBP). Tempos depois, verificou-se que a proteína Ss presente em soro de camundongos era idêntica à proteína C4 humana. Desta forma, a SsBP presente nos camundongos foi renomeada para *C4- Binding Protein* (C4BP). Em 1978, Fujita e colaboradores verificaram que a proteína C4BP era capaz de interagir com o fragmento C4b e não com a proteína C4 íntegra como se imaginava, e por isso alteraram novamente o nome da *C4-Binding Protein* para *C4b-Binding Protein*.

A principal função da proteína C4BP é regular a ativação da via clássica e das lectinas do SC. Sua concentração no soro de adulto é entre 200 µg/ml e 500 µg/ml (de Paula et al., 2003). Três isoformas de C4BP são encontradas no plasma humano. A isoforma principal, alfa7-beta1, é composta por sete cadeias alfas idênticas – cada uma com oito domínios *short consensus repeat* (SCR) – e uma cadeia beta com três SCRs. As outras isoformas são alfa7-beta0 e alfa6-beta1 (Sánchez-Corral et al., 1995). As cadeias alfa têm peso molecular de 75 kDa e a beta de 45 kDa, sendo que a molécula de C4BP tem peso molecular de, aproximadamente, 570 kDa. A ligação entre essas cadeias ocorre por pontes dissulfeto entre as cisteínas da porção C-terminal no sítio central da molécula de C4BP. Cada SCR é composto por, aproximadamente, 60 aminoácidos (aa) e forma um “núcleo” hidrofóbico importante para a interação desta molécula com outros componentes do soro humano (**Figura 8**). O C4BP inibe as vias clássica e das lectinas do SC de diferentes formas: a) ligando-se ao C4b e atuando como co-fator do FI o qual cliva C4b em fragmentos C4c e C4d e, portanto, inibe a formação da C3-convertase dessas vias (Fujita et al. 1978) (**Figura 9**); b) ligando-se ao C4b recém-formado, inibindo a formação de C3-convertase (Daha et al., 1980); ou c) acelerando o decaimento espontâneo da C3-convertase (Blom et al. 2003). Ligação iônica entre C4BP/C4b pode ocorrer envolvendo cada uma das cadeias alfa do C4BP, embora apenas 4 moléculas de C4b são capazes de se ligar simultaneamente à C4BP (Ziccard et al., 1984). Empregando mutantes de C4BP, Blom e colaboradores (2002) verificaram que os SCRs 2 e SCR 3 são necessários para que ocorra esta interação C4BP/C4b, enquanto os mutantes que não

Figura 9 - Inibição da via clássica e das lectinas do SC por C4BP.

A C4BP interage com a molécula de C4b e desloca a interação com a C2a, e, além disso, atua como co-fator de Fator I na clivagem de C4b em C4c e C4d. Em ambas as atividades, C4BP impede a formação/manutenção da C3-convertase das vias clássica e das lectinas, interrompendo assim a contínua ativação das mesmas (Morgan e Harris, 1999).

Em suas cadeias alfa e beta, a C4BP exibe sítios capazes de interagir com diversas proteínas como: a proteína S, heparina e a proteína amilóide P sérica (Blom et al., 2004). Os fungos *Candida albicans* (Meri et al., 2004) e *Aspergillus* (Vogl et al., 2008) e as bactérias *Neisseria gonorrhoeae* (Ngampasutadol et al., 2005), *Streptococcus pyogenes* (Pandiripally et al., 2002), *Haemophilus influenzae* (Hallström et al., 2007), *Moraxella catarrhalis* (Nordström et al., 2004), *Borrelia recurrentis* (Kraiczky et al., 2002), e, inclusive, a *Leptospira interrogans* (Barbosa et al., 2009; Castiblanco-Valencia et al., 2012) são capazes de interagir com o regulador C4BP (**Figura 10**), sendo este um possível mecanismo de evasão das vias clássica e das lectinas do SC. Recentemente, nosso grupo demonstrou a interação do C4BP com proteínas de *L. interrogans* – LcpA (Barbosa et al., 2010), LigA e LigB (Castiblanco-Valencia et al., 2012) (**Figura 11**).

Figura 10 - Interação de C4BP com *Leptospira*.

(A) SDS-PAGE seguido por Western blot utilizando anticorpo contra C4BP humana para detectar a interação da *L. interrogans* e *L. biflexa* com este regulador. (B) Nosso grupo também verificou que o C4BP ligado à membrana de *L. interrogans* conseguia atuar na clivagem de C4b em C4d e, portanto, mantinha sua função de regular a via clássica e das lectinas do SC (Barbosa et al., 2009).

Figura 11 - Interação do regulador C4BP com proteínas Ligs e LcpA de *L. interrogans*.

Proteínas Ligs (A) e proteína LcpA (B) interagem com o regulador C4BP. Os poços das microplacas foram revestidos com 1 μg de proteína recombinante e diferentes quantidades de C4BP purificada foram adicionadas (0 – 5 μg). A ligação foi detectada por meio de anticorpos específicos anti-C4BP por ELISA. A ligação da C4BP com as proteínas recombinantes foi comparada com sua ligação ao BSA ou à proteína LIC10301 (Castiblanco-Valencia et al., 2012).

1.3.1.5.2 Interação entre C4BP e proteínas de membrana de leptospiros patogênicas

Em 2010, nosso grupo identificou uma proteína de, aproximadamente, 20 kDa presente na membrana de *L. interrogans* capaz de interagir com o regulador C4BP do SC. Posteriormente, esta proteína bacteriana foi nomeada de *leptospiral complement regulator-acquiring protein A* – LcpA (Barbosa et al., 2010). Outras proteínas presentes em membranas de leptospiros patogênicas capazes de interagir com a C4BP já descritas são: LigA e LigB (Castiblanco-Valencia et al. 2012). Estas 2 proteínas apresentam entre si 100% de homologia na região N-terminal (entre os resíduos 1-630), enquanto a região C-terminal apresenta maior variedade de aminoácidos. Considerando seu tamanho relativamente grande, 3 fragmentos recombinantes foram produzidos e purificados para futuros experimentos: LigAC, LigBC e LigBN (Figura 12).

Figura 12 – Ilustração esquemática das proteínas LigA e LigB de leptospiros patogênicas.

Ilustração das proteínas LigA e LigB, com 13 e 12 *bacterial immunoglobulin-like (Big) domain repeats*, respectivamente. Os 6 primeiros domínios Big, e uma parte do domínio 7, são idênticos para as duas proteínas e, portanto, foram expressos na forma recombinante, construindo a LigBN. A proteína LigA recombinante que apresenta apenas metade do domínio Big 7 até a porção C-Terminal foi denominada LigAC. A proteína LigB recombinante, que apresenta apenas metade do domínio Big 7 até a porção C-Terminal foi denominada LigBC (Castiblanco-Valencia et al. 2012).

1.3.1.5.3 Inibidor de C1 esterase

Outro importante regulador das vias clássica e das lectinas do SC é o inibidor de C1 esterase (C1INH – 150kDa). Ele pertence à classe das serpinas – do inglês “*serine proteinase inhibitors*” – e sua estrutura é formada por uma cadeia simples de polipeptídios glicosilados com 478 aminoácidos (**Figura 13 A**) (Caliezi et al., 2000; Schapira et al., 1985). O C1INH pode ser sintetizado por diferentes células do organismo, como macrófagos, monócitos e, principalmente, pelos hepatócitos e está presente na concentração plasmática de 150 µg/ml (Nuijens et al., 1989). Este inibidor pode ser encontrado na forma livre (solúvel) ou à molécula de C1 de maneira reversível ou irreversível. A ligação reversível do C1INH ao complexo C1 ajuda na estabilização deste complexo e evita a sua auto-ativação. Quando a interação do C1INH ao complexo C1 ocorre de maneira irreversível, temos a formação do tetrâmero *C1INH-C1s-C1r-C1INH* e sua dissociação do C1q (**Figura 13 B**) (Ziccardi, 1982, 1985). Nesta forma, o C1INH interage com o sítio ativo da região serino protease das moléculas de C1r e C1s localizados, respectivamente, entre a Arginina⁴⁴⁶ e Isoleucina⁴⁴⁷ e Arginina⁴²⁶ e Isoleucina⁴²⁷ (**Figura 14**) (Budayova-Spano et al., 2002). Este tetrâmero se forma, e o C1INH sofre clivagem na Arg⁴⁴⁴ e Tyr⁴⁴⁵, formando um complexo estável com o C1s e C1r inibindo a subsequente proteólise de C4 e C2 e, portanto, a formação de C3-convertase (Salvesen et al., 1985; Sim et al., 1979). Este complexo formado pelo C1INH, C1r e C1s é estável e detectável por *Western blot* (130 kDa). Na via das lectinas o C1INH interage com MASP-1 e MASP-2, regulando semelhantemente à interação observada com C1r e C1s (Beinrohr et al., 2008).

Figura 13 - Representação da molécula de C1INH e da sua interação com as moléculas de C1s e C1r.

a)

b)

(a) C1INH apresenta uma cauda de aminoácidos bastante glicosilada e um domínio serpina pelo qual interage com as serino proteases C1r e C1s uma vez ativadas. Nesta condição, (b) forma-se o tetrâmero C1INH-C1r-C1s-C1INH que acaba se deslocando do complexo C1 (Morgan, Harris, 1999).

Figura 14 - Representação da molécula de C1r e C1s.

As proteínas C1r e C1s (aproximadamente 90 kDa), assim como outras proteases da família C1r/MASPs, apresentam seis domínios independentes. A região serino protease (SP), localizada na porção C-terminal, é precedida de 5 domínios não catalíticos – *Short consensus repeat* (SCR), *Complement subcomponents* (CUB) e *Epidermal growth fator* (EGF). O sítio ativo da região SP da subunidade C1r está localizado entre a Arginina 446 (R) e Isoleucina 447 (I), e da subunidade C1s está localizado entre a Arginina 426 (R) e Isoleucina 427 (I) (seta). A molécula de C1s é sintetizada na forma de cadeia única, mas quando ativada, é clivada em duas cadeias α (aproximadamente 60 kDa) e β (aproximadamente 30 kDa). Em condições fisiológicas as cadeias α e β permanecem ligadas por ponte dissulfeto, mesmo após a ativação de C1r ou C1s (Budayova-Spano et al., 2002; Morgan, Harris, 1999; Wong et al., 1999).

Além de regular a ativação da via clássica e das lectinas do SC, o C1INH também atua como um importante regulador do sistema calicreína-cinina (**Figura 15**) e também da cascata de coagulação. No sistema calicreína-cinina o C1INH atua inibindo a calicreína de agir sobre o cininogênio e, portanto, evitando a formação de bradicinina - importante vasodilatador e responsável pelo controle da permeabilidade vascular (Ghannam et al., 2013). Grande parte dos estudos presentes na literatura sobre o inibidor de C1INH está relacionada à sua função reguladora da via calicreína-cinina, em pacientes diagnosticados com angioedema hereditário (HAE). O HAE é uma rara doença hereditária autossômica dominante, caracterizada por deficiência de C1INH. Os pacientes diagnosticados com HAE podem ser divididos em 2 grupos: pacientes com HAE tipo I (85% dos casos) que apresentam níveis de C1INH diminuídos em até 80%, enquanto os pacientes com HAE tipo II (15% dos casos) apresentam níveis de C1INH disfuncional normal ou aumentado (Hsu et al., 2012). Pacientes com HAE apresentam edemas subcutâneos (Hsu et al., 2012) e hiperativação da via clássica do SC (Zingale et al., 2006) e a maioria deles apresenta baixos níveis de C4 e C2 – aproximadamente 30% do valor normal (Tarzi et al., 2007). Em relação à concentração de C3 e C4BP no soro destes pacientes há alguns dados conflitantes na literatura. Em 1999, Bergamaschini e colaboradores verificaram que os níveis de C3 nestes pacientes estão normais, enquanto os níveis

de C4BP apresentam-se diminuídos. Pelo fato da concentração de C4BP diminuir à medida que a ativação da via clássica acontece, o grupo propôs que, embora a deficiência de C1INH leve a uma hiper-ativação da via clássica do SC, com consumo das proteínas C4 e C2, o regulador C4BP atua evitando a formação de C3 convertase inibindo, portanto, a continuação da ativação do SC. Porém, em 2008, Varga e colaboradores mostraram que os pacientes com HAE apresentam níveis de C4BP 8 vezes maior que adultos normais e apresentam uma leve diminuição nos níveis de C3. Neste mesmo trabalho o grupo mostrou que a via alternativa desses pacientes apresenta atividade normal, porém, a via clássica e das lectinas destes indivíduos estão diminuídas.

Figura 15 – Papel do C1INH na ativação do sistema calicreína-cinina.

O C1INH atua como inibidor da calicreína, impedindo que esta atue sobre o cininogênio, evitando a sua conversão em bradicinina. Deste modo, o C1INH tem um importante papel na regulação da pressão arterial local, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e formação de edemas.

Devido à importância deste regulador na ativação das vias clássica e das lectinas do SC, alguns estudos avaliaram a interação do C1INH com proteínas de membrana de diversos patógenos, inclusive com bactérias espiroquetas (*Borrelia recurrentis*). A atividade reguladora de C1INH está presente nestas interações e confere maior sobrevivência do patógeno, pois este consegue escapar das ações do SC (Grosskinsky et al., 2010; Marr et al., 2011). Embora existam trabalhos demonstrando a evasão das vias clássica e lectinas por patógenos por meio da interação com este inibidor do SC, ainda não há na literatura trabalhos que demonstrem esta interação com *Leptospira*.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivos Gerais

O C4BP e C1INH são importantes reguladores das vias clássicas e das lectinas do SC. Neste trabalho propusemos aprofundar os estudos de interação das proteínas LcpA, LigAC e LigBC de *L. interrogans* (patogênica) com o regulador C4BP. Desejamos também verificar se há interação de *Leptospira* com C1INH e se estes patógenos utilizam esta propriedade para evadir a via clássica e das lectinas do SC.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar melhor a interação das proteínas LcpA, LigA e LigB de *L. interrogans* com o regulador C4BP, verificando quais domínios SCRs da molécula de C4BP estão envolvidos nas interações com as proteínas bacterianas LcpA, LigAC e LigBC por meio da utilização de C4BP mutantes;
- Analisar a interação do C1INH com *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (patogênica), *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona (atenuada) e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica), por meio de *Western blot* e ELISA.
- Verificar por *Western blot* se o C1INH ligado à membrana externa de leptospira, mantém sua função reguladora da via clássica do SC.
- Avaliar se a ativação da via clássica do SC pode ocorrer independente de anticorpos específicos na presença de leptospiros;
- Verificar a importância da via clássica, das lectinas e do C1INH para a morte de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (patogênica), *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona (atenuada) e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica).

Figura 16 - Mutantes recombinantes de C4BP humano empregados.

A isoforma mais comum de C4BP é composta por 7 cadeias alfa e 1 cadeia beta. Cada cadeia alfa é composta por 8 regiões denominadas *Short Consensus Repeat* (SCR). Estas proteínas recombinantes são construções resultantes de alterações gênicas, onde (Δ) representa uma determinada região cujo SCR foi deletado.

3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Sorovares de *Leptospira* e condições de cultivo

L. biflexa sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica), *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (patogênica) e *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona (patogênica atenuada) foram fornecidas pelo Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP), colaborador deste projeto. As leptospiros foram cultivadas a 29 °C por 7 dias sob condições aeróbicas em meio líquido EMJH (Difco- EUA) suplementado com 10% de albumina de soro bovino (BSA) .

4.2 Obtenção de soro humano normal

Como fonte de proteínas do SC, foram utilizados soros humanos não-imunes (SHNs) obtidos de doadores saudáveis, sem diagnóstico prévio de leptospirose e com sorologia negativa, pelo teste de MAT, realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP . Um volume aproximado de 40 ml de sangue foi colhido de cada doador em tubos de vidro sem anti-coagulante, onde permaneceu por 2 h a 4 °C. Após deslocamento e descarte dos coágulos, as amostras foram centrifugadas a 405 g por 15 min a 4 °C. Utilizamos uma mistura de soros de, pelo menos, 15 doadores saudáveis. Os soros foram aliquotados e armazenados a –80 °C até o momento de uso. Os soros foram coletados após os doadores assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.3 Obtenção de proteínas recombinantes de leptospiros patogênicas

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Dra. Angela Barbosa e a Dra. Patrícia Abreu do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan que nos cederam a proteína recombinante LcpA de leptospiros patogênicas (conforme descrito em Barbosa et al., 2010). As proteínas recombinantes LigAC e LigBC de leptospiros patogênicas foram obtidas por nosso grupo, conforme protocolo descrito em Castiblanco-Valencia et al., 2012.

4.4 Interação entre proteínas de leptospiros patogênicas – LcpA, LigAC e LigBC - com os diferentes mutantes de C4BP

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Dra. Anna M. Blom do Department of Laboratory Medicine, Lund University, Malmö, Suécia que nos cedeu os diferentes mutantes de C4BP (**Figura 13**). Para verificar a integridade das moléculas de C4BP mutantes, empregamos eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) em condições redutoras (tampão de amostra contendo 7% de β -mercaptoetanol, seguido por aquecimento a 96 °C por 3 min) e depois transferidas para membranas de nitrocelulose. Sítios de ligação inespecífica foram bloqueados com 10% de leite desnatado em salina tamponada (PBS) com 0,05% de Tween (PBS-T) por 18 h a 4 °C. Após três lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente com anticorpo anti-C4BP humano produzido em coelho (Calbiochem, Darmstadt, Germany) diluído 1:2000 em PBS-T com 5% de leite desnatado. Após três lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis Estados Unidos) diluído 1: 5000 em PBS-T com 5% de leite desnatado, por 1 h à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS-T, utilizamos *Enhanced Chemiluminescence System* (ECL – Amersham, GE Healthcare, Wisconsin, Estados Unidos) para revelar as bandas de proteínas, segundo instruções do fabricante.

Para verificar a integridade dos mutantes de C4BP por ELISA, utilizamos 1 μ g de cada C4BP mutante diluídos em PBS (volume final de 100 μ L) para revestir os poços da placa de ELISA. Após incubação de 16 h a 4 °C, os poços foram lavados duas vezes com 300 μ L de PBS e bloqueados com 300 μ L de BSA 3% por 2 h a 37 °C. Após nova lavagem, adicionamos anticorpo de coelho anti-C4BP humana (1:2000) diluído em PBS-T 1% BSA. Após 1 h de incubação a 37 °C seguida por três lavagens com PBS-T, adicionamos anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (1:5000) conjugado com peroxidase. Após três lavagens, adicionamos o substrato ortofenil-enodiamina (OPD) (0,04%) diluído em tampão citrato-fosfato (pH 5,0) com 0,015% de H₂O₂. A reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de H₂SO₄ 4 N. A absorbância a 492 nm foi lida em leitor de microplacas (Labsystems Uniscience, Multiskan EX).

A interação de C4BP recombinante com as proteínas de membrana de leptospiros patogênicas - LcpA, LigAC e Lig BC – foi quantificada por ELISA. Diluímos 1,5 µg de cada uma destas proteínas em PBS - volume final de 100 µL - para revestir os poços da placa de ELISA, por 16 h a 4 °C; como controle negativo utilizamos BSA ou a proteína recombinante de *L. interrogans* LIC 10301. Os poços foram lavados duas vezes com 300 µL de PBS e bloqueados com 300 µL de BSA 3% por 2 h a 37 °C. Após nova lavagem, adicionamos 1 µg de cada molécula recombinante de C4BP diluídas em PBS incubando a seguir por 1 h a 37 °C. A presença de C4BP aderida às proteínas recombinantes foi detectada após adição de anticorpo de coelho anti-C4BP humana (1:2000) (Calbiochem) diluído em PBS. Após 1 h de incubação a 37 °C seguida por três lavagens com PBS-T, foi adicionado anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (1:5000) conjugado com peroxidase (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Maryland, Estados Unidos). Após três lavagens, adicionamos o substrato OPD (0,04%) diluído em tampão citrato-fosfato (pH 5,0) com 0,01% de H₂O₂. Após aproximadamente 5 min, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 4 N. A absorbância a 492 nm foi lida em leitor de microplacas.

4.5 Interação entre as proteínas LcpA, LigAC e LigBC com heparina ou com C4BP na presença de NaCl e heparina

Para analisar a interação das proteínas recombinantes de leptospiros patogênicas com heparina, utilizamos 2 µg da mesma para recobrir os poços da placa de ELISA e após bloqueio e lavagens, incubamos com 1 µg de LcpA, LigA ou LigB. A presença das proteínas recombinantes que interagiram com a heparina foi detectada após adição de anticorpo de camundongo anti-LcpA (cedido pelo grupo da Dr. Angela Barbosa e Dra. Patrícia Abreu), anti-LigA ou anti-LigB (1:500). Após 1 h de incubação, foi adicionado anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (1:5000) conjugado com peroxidase (KPL).

Para verificar se a interação entre a C4BP e as proteínas LcpA, LigA e LigB era dependente de força iônica, utilizamos o mesmo protocolo acima descrito, porém empregando C4BP (Complement Technology, Texas, Estados Unidos) em diferentes concentrações de NaCl (50 mM, 100 mM, 200 mM e 400 mM). Para verificar se a

interação entre a C4BP e as proteínas LcpA, LigA e LigB era inibida na presença de heparina, utilizamos C4BP em diferentes concentrações de heparina (0,02 mg, 0,2 mg, 0,5 mg e 1,0 mg). A presença de C4BP aderida às proteínas recombinantes de leptospiros patogênicas foi quantificada por ELISA, conforme acima descrito.

4.6 Padronização dos ensaios de citometria de fluxo para verificar ativação da via clássica e interação dos reguladores do SC com *Leptospira* spp.

Embora a citometria de fluxo seja uma técnica muito utilizada em Imunologia, são raros os trabalhos na literatura que utilizam esta técnica em experimentos com leptospira. Desta forma, inicialmente padronizamos esta técnica para estudar a interação de leptospira com proteínas do SC. Primeiramente, utilizamos 2×10^8 de leptospiros patogênicas, não patogênicas ou atenuadas em um volume final de 300 μ l de PBS como controles, apenas para identificar e monitorar a população de *Leptospira* no equipamento. Para verificar a interação da molécula de C4BP com a leptospira, incubamos este mesmo número de bactérias com 2 μ g de C4BP purificada (*Complement Technology*) por 2 h em volume final de 500 μ l de PBS. Como controle negativo, incubamos as bactérias por 2 h apenas com PBS. Após incubação, as bactérias foram lavadas uma única vez – empregando centrifugação a 9300 g por 10 min a 10 °C - ressuspendidas e incubadas por 30 min, sob agitação à temperatura ambiente com 40 μ l de anti-C4BP humano produzido em coelho (*Calbiochem*) na diluição de 1:100 em solução PBS 1% BSA. Após lavagem, ressuspendemos as bactérias seguido por incubação com 40 μ l de anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluído 1:200 em solução de PBS contendo 1% BSA por 30 min sob agitação (temperatura ambiente) (*Abcam*, Cambridge, Inglaterra). Após várias lavagens, ressuspendemos as bactérias em volume final de 300 μ l de PBS para análise de citometria de fluxo (*Canto II BD Biosciences*, Maryland, Estados Unidos).

Para analisar a ativação da via clássica independente da presença de anticorpos específicos, quantificamos a co-deposição da proteína C1q e fragmentos de C4 sobre a superfície da leptospira. Utilizamos o mesmo protocolo acima descrito, porém inicialmente incubamos a suspensão de leptospiros com 150 μ l de SHN por 30 min. Após lavagens incubamos as bactérias com 40 μ l de anti-C1q humano produzido em cabra (*Complement Technology*) e 40 μ l de anti-C4 policlonal

humano produzido em coelho (*Complement Technology*). Após várias lavagens, incubamos as bactérias por 30 min com anti-IgG de cabra conjugado com FITC (*Abcam*) e anti-IgG de coelho conjugado com ficoeritrina (PE) (*Abcam*).

4.7 Análise da interação dos diferentes mutantes de C4BP com leptospira patogênica

Incubamos 2×10^8 leptospiros patogênicos e incubamos por 2 h à temperatura ambiente com 2 µg dos diferentes mutantes de C4BP (**Figura 16**) ou apenas com PBS (controle negativo), em volume final de 500 µl. Após incubação, as bactérias foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspendido em 40 µl de anti-C4BP humano produzido em coelho (*Calbiochem*), em diluição de 1:150 em PBS 1% BSA. A incubação foi por 30 min sob agitação e à temperatura ambiente. Após lavagem, incubamos a suspensão por 30 min sob agitação e à temperatura ambiente com 40 µl de anti-IgG de coelho conjugado com FITC em uma diluição de 1:200 em PBS contendo 1% BSA. Após várias lavagens, ressuspendemos as bactérias em volume final de 300 µl para análise de citometria de fluxo.

4.8 Interação de leptospiros com inibidor de C1 esterase ou com complexo C1 e análise da função reguladora do C1INH

Culturas de leptospiros foram centrifugadas a 4500 g por 20 min a 10°C e o precipitado foi lavado 2 vezes com PBS. Em seguida, contamos as bactérias por microscopia óptica sob campo escuro. Incubamos 1×10^9 bactérias com 25% de SHN (previamente tratado com 10 mM de EDTA por 30 min) como fonte de C1INH e C1s, ou incubamos com 10 µg de C1INH e, após lavagem, com 10 µg de C1s purificado, em um volume final de 0,5 ml a 37 °C por 2 h sob agitação. As bactérias foram lavadas 5 vezes com PBS 1x - centrifugadas a 9300 g por 10 min a 10 °C. Após a última centrifugação, retiramos 100 µl do sobrenadante para controle, para confirmar a ausência de proteínas livres. Os precipitados foram então ressuspendidos em 100 µl de PBS e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% ou 12% (SDS-PAGE) em condições redutoras (tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol e amostra aquecida por 3min a 96 °C) e depois transferidas para

membranas de nitrocelulose. Sítios de ligação inespecífica foram bloqueados com 10% de leite desnatado em PBS com 0,05% de Tween (PBS-T) por 18 h a 4 °C. Após três lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente com anticorpo anti-C1INH humano, feito em cabra, (Complement Technology) diluído 1:2000 em PBS-T com 5% de leite desnatado. Após três lavagens, as membranas foram incubadas com anti-IgG de cabra conjugado à peroxidase (Sigma) diluído 1: 5000, em PBS-T com 5% de leite desnatado, por 1 h à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS-T, utilizamos *Enhanced Chemiluminescence System* (Amersham) para revelar as bandas de proteínas, segundo instruções do fabricante.

A concentração de C1INH na superfície bacteriana também foi quantificada por ELISA. Para este experimento, adaptamos o protocolo convencional de ELISA, que é realizado diretamente em placa de poliestileno (*Flat bottom without Lid High Bind* 3590 Costar, Nova Iorque, Estados Unidos) e realizamos todas as etapas em tubos tipo *Eppendorf*. Transferimos 200 µL das amostras dos tubos para a placa de poliestileno apenas para a leitura da absorbância.

Incubamos em tubos *Eppendorf*, por 2 h à temperatura ambiente um total de 2×10^8 leptospiros em solução final de 1 mL PBS acrescida de 5 µg de C1INH purificado (*Complement Technology*). Após incubação, centrifugamos a 9300 g por 10 min a 10 °C. Ressuspendemos o precipitado em 1 mL de PBS (este passo foi repetido por 4x). Após as lavagens, ressuspendemos as bactérias em 1 mL de solução PBS-T com 1% BSA com anticorpo anti-C1INH feito em cabra (*Complement Technology*) na diluição de 1:2000 e incubamos por mais 1 h à temperatura ambiente. Lavamos novamente a suspensão por 4 vezes e incubamos as bactérias em 1 mL de solução PBS-T 1% BSA com anticorpo anti-IgG de cabra (*KPL*), conjugado com peroxidase, na diluição de 1:5000 por 1 h à temperatura ambiente. Após 3 lavagens, ressuspendemos o precipitado em 100 µL do substrato OPD e incubamos por aproximadamente 2 min. Adicionamos 50 µL de H₂SO₄ 4N para interromper a reação. Transferimos o conteúdo de cada micro-tubo para um poço da placa de ELISA e efetuamos a leitura da absorbância a 492 nm em leitor de microplacas.

4.9 Avaliação da sobrevivência de leptospira na presença do SC

Para verificar a importância da via clássica e das lectinas na morte das leptospiros incubamos 2×10^7 bactérias patogênicas, atenuadas e não patogênicas, por 2 h a 37 °C com 20% de SHN, soro depletado de FB (Complement Technology) ou PBS (controle) em volume final de 100 µl de PBS. Após o período de incubação, utilizamos a câmara de *Petroff-Hausser* para quantificar o número de leptospiros viáveis. As leptospiros quando morrem fragmentam-se e são morfologicamente distintas das leptospiros vivas e raramente são visíveis na microscopia sob campo escuro. Consideramos como 100%, o número de bactérias vivas presentes no grupo controle (PBS).

4.10 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa *Graphpad Prism*, da companhia *Graphpad Software Incorporation* (Califórnia, Estados Unidos), versão 4. Para análise comparativa entre 2 grupos, utilizamos o teste *t de Student*. Em comparações entre 3 ou mais grupos, utilizamos o teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Neste trabalho, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação dos domínios SCRs de C4BP responsáveis pela interação com as proteínas LcpA, LigAC e LigBC de leptospiros patogênicas

Em 2009, Barbosa e colaboradores estudaram a interação de C4BP com proteínas recombinantes LcpA, LigAC e LigBC de superfície de leptospiros patogênicos. Neste presente trabalho, buscamos mapear as regiões da C4BP responsáveis pela interação com essas proteínas de leptospiros. Antes de iniciar os experimentos utilizando o painel de moléculas C4BP recombinantes (**Figura 16**), procedemos com *Western blot* para confirmar a integridade destas proteínas. Embora os mutantes de C4BP estivessem aparentemente íntegros, o anticorpo policlonal anti-C4BP humana empregado não revelou a presença de bandas correspondentes aos diferentes mutantes de C4BP com semelhante intensidade (**Figura 17**). Também observamos que, embora cada SCR da molécula C4BP seja composto por aproximadamente 60 aminoácidos, a mutante C4BP Δ SCR 3 e C4BP Δ SCR 8 migram mais rapidamente em SDS-PAGE que as demais proteínas C4BP recombinantes mutantes e selvagem (**Figura 17**). Este resultado poderia ser explicado pelo fato do SCR 3 (172 - 235 aa) e SCR 8 (482 – 540 aa) apresentarem, respectivamente, uma e duas regiões glicosiladas (**Figura 18**). Na sua ausência, as proteínas menores, com menos carboidratos, migram mais rapidamente em SDS-PAGE.

Figura 17 - Análise da integridade das diferentes proteínas C4BP recombinantes por *Western blot*.

Submetemos 200ng de cada proteína mutante de C4BP em SDS-PAGE para verificar sua integridade. As bandas da C4BP selvagem (WT), C4BP mutante faltando a região SCR 1 ($\Delta 1$), SCR 2 ($\Delta 2$), SCR 3 ($\Delta 3$), SCR 4 ($\Delta 4$), SCR 5 ($\Delta 5$), SCR 6 ($\Delta 6$), SCR 7 ($\Delta 7$) ou SCR 8 ($\Delta 8$) das cadeias alfa foram evidenciadas pelo uso de anti-C4BP humana produzido em coelho.

Figura 18 - Sequência dos aminoácidos que compõem a cadeia alfa da C4BP humana.

```

MHPPKTPSGA LHRKRKMAAW PFSRLWKVSD PILFQMTLIA ALLPAVLGNC 50
GPPPTLSFAA PMDITLTETR FKTGTTLKYT CLPGYVRSHS TQTLTCNSDG 100
EWVYNTFCIY KRCRHPGELR NGQVEIKTDL SFGSQIEFSC SEGFFLIGST 150
TSRCEVQDRG VGWSHPLPQC EIVKCKPPPD IRNGRHSCEE NFYAYGFSVT 200
YSCDPRFSLG GHASISCTVE NETIGVWRPS PPTCEKITCR KPDVSHGEMV 250
SGFGPIYNYK DTIVFKCQKG FVLRGSSVIH CDADSKWNPS PPACEPNSCI 300
NLPDIPHASW ETYPRPTKED VYVVGTVLRY RCHPGYKPTT DEPTTVICQK 350
NLRWTPYQGC EALCCPEPKL NNGEITQHRK SRPANHCYVF YGDEISFSCH 400
ETSRFSAICQ GDGTWSPRTP SCGDICNFPP KIAHGHIYQS SSYSFFKEEI 450
IYECDKGYIL VGQAKLSCSY SHWSAPAPQC KALCRKPELV NGRLSVDKDQ 500
YVEPENVTIQ CDSGYGVVGP QSITCSGNRT WYPEVPKCEW ETPEGCEQVL 550
TGKRLMQCLP NPEDVKMALE VYKLSLEIEQ LELQRDSARQ STLDKEL

```

Glicosilação de C4BP é dependente da presença de três resíduos de Asparagina (N) encontrados nas cadeias alfa. Um deles é encontrado no domínio SCR 3 (172 - 235 aa) e SCR 8 e dois no SCR 8 (482 - 540 aa) (Morley, Walport, 2000).

Embora a quantidade de C4BP recombinantes utilizada na análise por *Western blot* tenha sido a mesma para cada um dos mutantes, observamos que as C4BPs recombinantes Δ SCR 6 e Δ SCR 8 não foram detectadas com similar intensidade nesta técnica. Desta forma, empregamos um outro método (ELISA) para descartar a possibilidade de degradação completa destas proteínas mutantes, o que poderia comprometer a interpretação correta dos nossos resultados. Para esta etapa, revestimos os poços com 1 μ g de cada mutante de C4BP e, após interação com anticorpos primário e secundário, medimos e comparamos a densidade óptica dos diferentes C4BP mutantes (**Figura 19**).

Figura 19 – Utilização da técnica de ELISA para detecção dos diferentes mutantes de C4BP

Os poços foram revestidos com 500 ng dos diferentes mutantes de C4BP. Após lavagens e bloqueio, incubamos por 1h com anti-C4BP humana produzido em coelho. Após lavagens, incubamos a reação com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase para detecção das proteínas C4BP selvagem (WT), C4BP mutante com deleção da região SCR 1 ($\Delta 1$), SCR 2 ($\Delta 2$), SCR 3 ($\Delta 3$), SCR4 ($\Delta 4$), SCR 5 ($\Delta 5$), SCR 6 ($\Delta 6$), SCR 7 ($\Delta 7$) ou SCR 8 ($\Delta 8$) das cadeias alfa previamente fixadas na placa.

Pelo fato do anticorpo anti-C4BP empregado ser capaz de reconhecer os diferentes mutantes de C4BP por ELISA em similar intensidade (**Figura 19**), optamos por esta metodologia para investigar a interação dos diferentes mutantes de C4BP humana com as proteínas recombinantes de leptospiros patogênicos LcpA, LigAC e LigBC. Neste experimento, verificamos que a interação das C4BP Δ SCR 4, C4BP Δ SCR 7 e C4BP Δ SCR 8 com as proteínas recombinantes LcpA, LigAC e LigBC era menor quando comparada com a interação dessas proteínas de *Leptospira* com a C4BP selvagem (controle 100%). Desta forma, este resultado

evidencia a importância das regiões SCR 7 e SCR 8 da molécula de C4BP para a sua interação com as proteínas recombinantes LcpA, LigAC e LigBC de leptospiros patogênicas ($p<0,05$). Observamos também que a região SCR 4 é importante para a interação da C4BP com a proteína LigAC ($p<0,05$), uma vez que sua interação com a LigBC e LcpA apresentou uma diminuição, porém não significativa estatisticamente.

Figura 20 - Identificação dos domínios de C4BP responsáveis pela interação com as proteínas LcpA, LigAC e LigBC de leptospiros patogênicas.

A interação de LcpA, LigAC ou LigBC com os diferentes mutantes de C4BP foi determinada, considerando-se a interação com C4BP recombinante selvagem (WT) como 100%. Verificamos que tanto a C4BP ΔSCR 7 como a C4BP ΔSCR 8 apresentaram menor interação com as proteínas recombinantes LcpA, LigAC e LigBC ($p<0,05$). A proteína recombinante LigAC também apresentou menor interação com a molécula C4BP ΔSCR 4 ($p<0,05$).

Considerando-se que a heparina liga-se aos domínios SCR1, SCR 2 e SCR 3 da C4BP selvagem, avaliamos a interação entre as proteínas LcpA, LigAC e LigBC

de leptospiros patogênicas com a C4BP selvagem na presença de diferentes concentrações de heparina (0,2 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL), para confirmar indiretamente que a interação entre essas proteínas independem das regiões SCR 1, SCR 2 e SCR 3 da C4BP. Surpreendentemente, a ligação da C4BP com a proteínas LcpA, LigAC e LigBC foi totalmente abolida na presença de heparina (**Figura 21**). Utilizamos a proteína LIC 10301 como controle negativo, uma vez que ela não interage com a molécula de C4BP. Para confirmar que a ligação da heparina na molécula de C4BP não deveria competir com a interação da C4BP com LcpA, LigAC e LigBC, uma vez que elas interagem em regiões distintas da molécula C4BP, investigamos se a heparina não poderia interagir diretamente com essas proteínas recombinantes de leptospiros patogênicas e, assim, inibir a ligação delas com a molécula de C4BP (**Figura 22**).

Figura 21 – Interação das proteínas recombinantes LcpA, LigAC e LigBC com a C4BP na presença de heparina.

Utilizamos 1 µg das proteínas recombinantes de leptospiros patogênicas – LcpA, LigAC ou LigBC – para revestir os poços da placa de ELISA. Após bloqueio, diluímos 1 µg de C4BP em diferentes concentrações de heparina incubando em seguida para verificar a interação com as proteínas de leptospira previamente fixada na placa. As ligações relativas das proteínas de leptospiros patogênicas com C4BP na presença de heparina foram sempre comparadas com o controle 100% (sem heparina). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Figura 22 – Interação das proteínas recombinantes de leptospiros patogênicas LigAC e LigBC e do regulador C4BP com heparina.

Utilizamos 2 µg de heparina para revestir os poços da placa de ELISA. Após bloqueio incubamos com 1 µg de C4BP ou com diferentes concentrações das proteínas recombinantes LigAC e LigBC de leptospiros patogênicas (0,1;0,25.0,5; e 1 µg) para verificar a interação direta destas proteínas à heparina. Utilizamos anticorpo anti-C4BP humana, anti-LigAC ou Anti-LigBC para detecção destas proteínas ligadas à heparina. Como controle negativo, incubamos a heparina apenas com BSA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Estes resultados indicam que as proteínas LigAC e LigBC de leptospiros patogênicas são capazes de interagir diretamente com heparina, um importante componente de matriz extracelular.

5.2 Interação entre as proteínas LcpA, LigAC e LigBC de leptospiros patogênicas e C4BP em diferentes concentrações de NaCl

Para melhor caracterizar a interação entre as proteínas recombinantes de leptospiros patogênicos e a C4BP, diluímos esta proteína reguladora em diferentes concentrações de NaCl (50mM, 100mM, 200mM e 400mM) para verificar se a interação da proteína C4BP com as proteínas recombinantes de leptospiros patogênicos – LcpA, LigAC e LigBC seria dependente de força iônica (**Figura 23**).

Figura 23 - Ligação de C4BP com as proteínas de membrana de leptospiros patogênicos LcpA, LigAC e LigBC sob diferentes concentrações de NaCl.

Placas foram revestidas com 1 µg das proteínas recombinantes LcpA, LigAC ou LigBC de leptospiros patogênicos. Após bloqueio, diluímos a C4BP em diferentes concentrações de NaCl (50mM - 400mM) para avaliar a interferência de forças iônicas na interação de C4BP com as proteínas recombinantes de leptospiros patogênicos.

Estes resultados nos mostram a importância das forças iônicas na interação entre as proteínas LcpA, LigAC e LigBC de leptospiros patogênicos com a molécula de C4BP.

5.3 Padronização dos ensaios de citometria de fluxo utilizando *Leptospira* spp.

Devido à pequena espessura das leptospiiras (entre 0,1 – 0,2 μm), grande heterogeneidade de tamanho (6 – 20 μm), granulosidade, sua forma helicoidal e dadas as dificuldades técnicas que estas especificações representam, raros são os trabalhos na literatura que utilizam a técnica de citometria de fluxo para estudos quantitativos empregando esta bactéria.

Para a padronização desta técnica, vários testes foram realizados para detectar a população de leptospira de acordo com sua granulosidade (SSC) e tamanho (FSC). Devido ao pequeno tamanho e espessura da leptospira, ao invés de utilizar os parâmetros de SSC e FSC em escala linear (**Figura 24 A**), empregamos escala logarítmica (**Figura 24 B**). Desta forma, conseguimos alterar os parâmetros de SSC e FSC para que a população de leptospira ficasse localizada próxima ao centro do gráfico, facilitando assim sua análise. Outro importante fator para a padronização deste ensaio foi a alteração no limiar dos lasers SSC e FSC, como mostra a **Figura 24 C e 24 D**. A população de leptospiiras pode ser detectada sem alterar o limiar de SSC e FSC (**Figura 24C**) e, embora se apresente bem definida, apenas 49% da real população de leptospiiras foi detectada e os 51% restantes estavam abaixo do limiar de detecção. Ao diminuir esse limiar (**Figura 24 D**), notamos que a população apresentava-se mais heterogênea, porém novos eventos eram detectados, acompanhados por aumento de 100% no número de eventos capturados se comparados com os eventos adquiridos antes da alteração do limiar dos lasers. Devido à grande heterogeneidade das leptospiiras, bem como seu tamanho e pouca espessura, definimos a janela limitante para aquisição de eventos (*gate*) incluindo todos os dados representados no gráfico SSC x FSC, garantindo assim que toda a população de leptospiiras fosse selecionada para análise (**Figura 24 E**).

Figura 24 - População de *Leptospira* spp. visualizada por citometria de fluxo de acordo com seu tamanho (FSC) e granulidade (SSC).

Utilizamos diferentes estratégias para definir a população de leptospiros, e assim, realizar as análises posteriormente pelo *software* "FlowJow". (A) A população de leptospiros visualizada em modo linear. Neste modo, não conseguimos retirar a população do eixo SSC e FSC, mesmo alterando significativamente a voltagem desses parâmetros. (B) Temos a população de leptospiros visualizada em modo logarítmico, sem alterar o limiar de SSC e FSC. (C) A população em modo logarítmico, sem alterar o limiar de SSC e FSC. (D) Após alterar o limiar de SSC e FSC, notamos um maior número de eventos. (E) Para as análises, definimos o *gate* em toda a extensão do gráfico, uma vez que as leptospiros apresentam heterogeneidade de tamanho e granulidade muito grande.

Decidimos padronizá-la e empregá-la para confirmar a deposição simultânea de C1q e fragmentos de C4, além de verificar a interação da leptospira patogênica com os diferentes mutantes de C4BP.

5.4 Análise da interação entre a leptospira patogênica e os diferentes mutantes de C4BP por citometria de fluxo

Para realizar estes experimentos, utilizamos 2×10^8 leptospiras pré-incubadas com 2 μ g de C4BP purificada ou, como controle, apenas com PBS, para delimitar a intensidade basal de fluorescência gerada pela leptospira pela possível autofluorescência e a interações inespecíficas com os anticorpos (controle negativo – linha vermelha no histograma e PBS no gráfico de barras). A ligação de C4BP à leptospira patogênica foi analisada pelo histograma (linha azul) e pela intensidade média de fluorescência (MFI) (Figura 25).

Figura 25 - Interação do regulador C4BP com leptospira patogênica.

(A) Fluorescência emitida pela leptospira tratadas com PBS (vermelho) ou com 2 μ g de C4BP purificado (azul). Empregamos anticorpo policlonal anti-C4BP humana produzido em coelho, seguido de anti-IgG de coelho conjugado com FITC. A média da intensidade de fluorescência (MFI) foi calculada e está representada em (B).

Após a padronização deste ensaio, utilizamos os diferentes mutantes de C4BP (2 μ g) para verificar qual região SCR da C4BP seria responsável pela interação com a leptospira patogênica íntegra, e não apenas com suas proteínas de membrana purificadas. Confirmamos a importância dos SCR 4, SCR 7 e SCR 8 na interação da C4BP com a leptospira patogênica e, interessante, verificamos que incubada com a molécula C4BP Δ SCR 1 a sua interação é aproximadamente 3 vezes maior do que sua interação com a C4BP WT (Figura 26).

Figura 26 - Mapeamento das regiões SCRs das cadeias alfa da C4BP responsáveis pela interação com a superfície de leptospira patogênica.

Média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) emitida pela leptospira tratada com 2 µg de C4BP mutantes purificados. Empregamos anticorpo policlonal anti-C4BP humana produzido em coelho, seguido de anti-IgG de coelho conjugado com FITC. Como controle, utilizamos a mesma bactéria incubada apenas com o anticorpo primário e secundário, sem adição de C4BP.

5.5 Inibidor de C1 esterase interage com superfície de diferentes espécies de *Leptospira*

Neste trabalho, analisamos a interação de C1INH purificado com as leptospiras patogênicas, atenuadas e não patogênicas por *Western blot* (**Figura 26**) e por ELISA (**Figura 27**).

Figura 26 – Interação do C1INH com a superfície de *Leptospira* spp.

As cepas de leptospiros atenuada, patogênica e não patogênica foram incubadas com 10µg de C1INH purificado. Os sobrenadantes da última lavagem foram retirados e utilizados como controle para demonstrar a ausência da proteína C1INH livre no sobrenadante. Os precipitados foram ressuspensos e aplicados em SDS-PAGE para verificar a presença de C1INH ligado à superfície das leptospiros. Como controle positivo utilizamos 100 ng de C1INH purificado aplicado diretamente no gel – resultado representativo de três experimentos realizados.

Os dados obtidos por ELISA (**Figura 27 A e B**) foram analisados estatisticamente empregando o teste ANOVA para comparar a quantidade de C1INH capturado pelas diferentes cepas de *Leptospira*. A leptospira atenuada apresentou uma menor interação com o C1INH ($p < 0,05$) quando comparada com a patogênica e com a cepa não patogênica. A leptospira patogênica apresentou interação intermediária com o C1INH purificado e a leptospira não patogênica apresentou a maior interação com o C1INH purificado ($p < 0,001$) (**Figura 27 A**). Porém, não verificamos diferenças significativas na quantidade de C1INH sérico ligado à membrana das diferentes cepas de leptospira estudadas ($p > 0,05$) (**Figura 27 B**).

Figura 27 - Quantificação da proteína C1INH ligada à membrana das diferentes cepas de leptospira

As leptospiros atenuada, patogênica e não patogênica foram incubadas com 10 µg de C1INH purificado ou com 150µl de SHN não imune. Após diversas lavagens ressuspendemos os precipitados de leptospiros na presença de anti-C1INH humano produzido em cabra. Após diversas lavagens ressuspendemos os precipitados na presença de anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase para quantificação do C1INH ligado à membrana das leptospiros.

5.6 Inibidor de C1 esterase ligado à *Leptospira* mantém sua função reguladora da via clássica do SC

Uma vez ativada a via clássica, o C1INH (105 kDa) liga-se rapidamente à região serino protease da molécula de C1r ativado (32 kDa – **Figura 14**) ou de C1s ativado (30 kDa), de maneira covalente, formando o complexo C1INH/C1r e C1INH/C1s - aproximadamente 130 kDa (**Figura 13**). Para verificar a função reguladora do C1INH ligado à membrana das leptospiros, incubamos as bactérias com C1INH, presente no SHN, ou purificado, e após lavagens, incubamos com a proteína C1s ativada, também purificada (**Figura 28**).

Figura 28 - C1INH ligado à membrana de *Leptospira* mantém sua capacidade de interagir com a proteína C1s do SC.

(A) As diferentes cepas de *Leptospira* foram incubadas com C1INH purificado (105kDa). Após 2 h, lavamos a suspensão para retirar o excesso de C1INH e em seguida adicionamos a proteína C1s purificada para verificar a função reguladora do C1INH. (B) Maior tempo de exposição do mesmo gel apresentado em (A). (C) Incubamos as diferentes cepas de *Leptospira* com SHN, previamente inativado por EDTA, por 2 h. Utilizamos anticorpo anti-C1INH humano para verificar a interação deste regulador com a membrana de leptospira e, por meio da visualização do complexo C1INH/C1s (130kDa), confirmamos a função reguladora do C1INH ligado à membrana de leptospira. Como controle positivo da reação, utilizamos C1INH + C1s na ausência de leptospira. Observamos resquícios de C1INH sérico presentes nos sobrenadantes retirados após a sétima lavagem das leptospiras atenuada, patogênica e não patogênica – resultado representativo de três experimentos realizados.

5.7 Ativação da via clássica do SC por leptospiros, independente de anticorpos específicos

Em 2009 (Barbosa et al), nosso grupo mostrou a importância das vias alternativa, clássica e das lectinas para a morte de diferentes espécies de *Leptospira*. As leptospiros patogênicas sobrevivem mesmo na presença das 3 vias do SC, enquanto as leptospiros atenuadas são parcialmente susceptíveis à via clássica do SC e resistentes às vias alternativa e das lectinas. As leptospiros não patogênicas são susceptíveis à via alternativa, eliminando estas bactérias em poucas horas.

Verificamos neste trabalho que as leptospiros patogênicas, incubadas com SHN são capazes de interagir com o C1INH e este mantém sua capacidade de se ligar com C1r e C1s ativados, indício de ativação da via clássica do SC. Para confirmar a ativação da via clássica independente de anticorpos específicos contra *Leptospira*, constatamos a co-deposição de fragmentos de C4 e da proteína C1q (**Figura 29 e 30**) diretamente sobre a superfície destas bactérias.

A deposição de C1q e de fragmentos da proteína C4 sobre a superfície de leptospiros atenuadas, patogênicas e não patogênicas indica que a ativação da via clássica pode ocorrer mesmo na ausência de anticorpos específicos (**Figura 29 e 30**). Ainda que as leptospiros patogênicas sejam resistentes à lise pelo SC e as leptospiros atenuadas sejam parcialmente susceptíveis à lise pela via clássica do SC, observamos deposição de C1q e de fragmentos de C4 sobre a superfície destas bactérias. Embora as leptospiros não patogênicas sejam susceptíveis à morte pelo SC, não há dados na literatura que demonstrem a real contribuição das vias clássica ou das lectinas para a morte desta bactéria. Ao constatar a interação de leptospiros não patogênicas com o C1INH, importante regulador da via clássica e das lectinas do SC, perguntamo-nos se esta interação poderia ser utilizada por esta bactéria como mecanismo de evasão imune à via clássica e das lectinas do SC. Perguntamo-nos também se a menor deposição de fragmentos de C4 em leptospiros não patogênicas comparada com as leptospiros atenuadas poderia ser devida a sua maior interação com C1INH e, portanto, maior inibição da clivagem da proteína C4. Para responder estas perguntas quantificamos por citometria de fluxo o número de leptospiros viáveis após tratamento com diferentes tipos de soros.

Figura 29 - Análise da deposição de C1q e fragmentos da proteína C4 em *Leptospira* spp.

Sobreposição dos histogramas representando a detecção da fluorescência emitida pelos fluorocromos FITC (coluna da esquerda) ou PE (coluna da direita). Em vermelho, o histograma do grupo controle – bactérias incubadas apenas com os anticorpos primário (anti-C1q humano produzido em cabra e anti-C4 humano produzido em coelho) e secundário (anti-IgG de cabra conjugado com FITC e anti-IgG de coelho conjugado com PE) para detectar a fluorescência emitida pela ligação inespecífica destes anticorpos diretamente com a bactéria. Em azul, o histograma representando a bactéria previamente incubada com SHN não-imune e posteriormente incubada com os anticorpos primário e secundário.

Figura 30 - Análise da deposição de C1q e fragmentos da proteína C4 como marcadores de ativação da via clássica do SC.

Deposição de C1q e fragmentos de C4 na superfície de leptospiros (a) não patogênicas, (b) patogênicas e (c) patogênicas atenuada como indício de ativação da via clássica ou das lectinas do SC. Na coluna da esquerda está representado o grupo controle, onde as respectivas bactérias foram incubadas com PBS e logo em seguida incubadas com anticorpo primário – anti-C1q e anti C4 policlonal – e anticorpos secundários – respectivamente, anti-IgG de cabra conjugado com FITC e anti-IgG de coelho conjugado com PE. A coluna da direita representa as mesmas bactérias incubadas com SHN por 30 min. Após lavagens, a co-deposição de C1q e C4 foram avaliadas como forma de analisar a ativação da via clássica ou das lectinas de forma independente de anticorpos específicos contra leptospiros.

5.8 Sobrevivência de leptospira na presença de SHN e soro depletado de Fator B

Para confirmar a importância da ativação do SC para a morte das diferentes cepas de *Leptospira* spp., conforme publicado previamente pelo nosso grupo (**Figura 7**), realizamos o ensaio de sobrevivência separadamente para leptospiros patogênicas, não patogênicas e atenuadas, utilizando SHN (**Figura 31**). Conforme ilustrado na **Figura 29 e 30**, ao incubar leptospiros com SHN não-imune, notamos co-deposição de C1q e fragmentos de C4, sugerindo, portanto, a ativação da via clássica do SC de maneira independente de anticorpos específicos. Deste modo, avaliamos a sobrevivência dessas bactérias na presença de soro humano não-imune depletado de FB, uma vez que a ativação da via alternativa é ausente neste soro, e assim confirmar a ativação da via clássica e sua relativa importância na morte da leptospira (**Figura 31 e 32**). Também comparamos entre si a sobrevivência de leptospiros patogênicas, atenuadas e não patogênicas em SHN e soro depletado de FB (**Figura 32**).

Figura 31 - Ensaio de sobrevivência de *Leptospira* spp. na presença de SHN e soro humano depletado de FB.

Incubamos as diferentes cepas de *Leptospira* com SHN e soro depletado de FB para verificar a importância do SC na morte dessas bactérias. Observamos a sobrevivência de, aproximadamente, 100% da *Leptospira* patogênica na presença de proteínas do SC. A sobrevivência da cepa atenuada na presença de SC foi de aproximadamente 60% enquanto a cepa não patogênica teve sobrevivência menor do que 20%. A importância da via clássica e das lectinas foi analisada utilizando soro depletado de FB. As três cepas apresentaram porcentagem de morte em soro depletado de FB semelhante à morte vista em SHN ($p > 0,05$).

Figura 32 - Correlação da sobrevivência de leptospiros patogênicos, não patogênicos e atenuados na presença de SHN ou soro humano depletado de FB.

Comparamos a sobrevivência de leptospiros atenuada, patogênica e não patogênica entre si na presença de SHN ou soro humano depletado de FB. Verificamos uma diferença significativa na sobrevivência da leptospira patogênica quando comparada com a leptospira atenuada ou com a leptospira não patogênica ($p < 0,001$) em SHN e soro humano depletado de FB. Observamos também uma diferença significativa na sobrevivência da leptospira atenuada quando comparada com a leptospira não patogênica ($p < 0,001$).

Para estudar o papel do C1INH na sobrevivência destas bactérias, utilizamos soros deficientes de C1INH (de pacientes com HAE) como fonte de proteínas do SC (**Figura 33**). As leptospiros atenuadas foram mais susceptíveis à morte pelo SC na presença de soro deficiente de C1INH quando comparado com SHN (**Figura 33 A**). Resultado inverso ao observado com a leptospira não patogênica, que teve uma sobrevivência maior em soro deficiente de C1INH quando comparado com a sobrevivência em SHN (**Figura 33 B**). Observamos também, que na presença de soro humano deficiente de C1INH, não há diferença estatística na sobrevivência da cepa não patogênica, quando comparada a sobrevivência da cepa atenuada ($p > 0,05$) (**Figura 33 C**). Não observamos diferença na sobrevivência da leptospira patogênica incubada com soro deficiente de C1INH (**Figura 33 D**). Para confirmar a importância do C1INH na sobrevivência destas bactérias, reconstituímos o soro de pacientes com HAE com diferentes quantidades de C1INH purificado (**Figura 34**).

Figura 33 – Ensaio de sobrevivência de *Leptospira* spp. na presença de SHN e soro humano deficiente de C1INH (HAE).

Utilizamos soro humano deficiente de C1INH (HAE) para verificar a importância da interação deste regulador com as leptospiros atenuada, patogênica e não patogênica. Observamos (A) menor sobrevivência de leptospira atenuada e (B) uma maior sobrevivência de leptospira não patogênica na presença de soro deficiente de C1INH quando comparadas à sobrevivência em SHN. (C) Na presença de soro humano deficiente de C1INH, não há diferença estatística na sobrevivência da cepa não patogênica, quando comparada à sobrevivência da cepa atenuada ($p > 0,05$). (D) Sobrevivência de leptospira patogênica em soro deficiente de C1INH é semelhante à sobrevivência em SHN ($p > 0,05$).

Figura 34 – Sobrevida de leptospiros não patogênica e atenuada na presença de soro humano deficiente de C1INH após reconstituição dos níveis séricos de C1INH.

Após a reconstituição dos níveis séricos de C1INH em soro deficiente deste regulador (HAE), verificamos que a sobrevida das leptospiros não patogênicas e leptospiros atenuadas se assemelham a sobrevida destas bactérias em SHN ($p>0,05$).

6 DISCUSSÃO

Diversos grupos de pesquisa estudam a interação entre proteínas reguladoras do SC e proteínas de membrana de patógenos como estratégia utilizada para escapar da morte no hospedeiro. Meri e colaboradores (2006) mostraram que a espiroqueta *Borrelia* pode interagir com o FH e C4BP como forma de escapar, respectivamente, das vias alternativa e clássica do SC. Grosskinsky et al. (2010) mostraram que *Borrelia recurrentis* (resistente à lise pelo SC) expressa a proteína de membrana CihC capaz de se ligar ao C4BP e C1INH, utilizando-os para evadir a via clássica e, possivelmente, a via das lectinas do SC. Em 2005, Meri e colaboradores publicaram um dos primeiros trabalhos sobre a interação de leptospiros com reguladores do SC. Eles mostraram que apenas leptospiros patogênicos são capazes de interagir com FH e inibir a ativação da via alternativa do SC. Em 2012, nosso grupo mostrou que a *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (patogênica - resistente à lise pelo SC), quando incubada com soro humano depletado de FH, apresentava menor sobrevivência do que quando incubado com SHN. Porém, quando o soro depletado de FH era reconstituído com diferentes quantidades dessa proteína, a sobrevivência desta bactéria era semelhante à sobrevivência observada em SHN, evidenciando assim a importância deste regulador para a resistência de leptospiros patogênicos no hospedeiro (Castiblanco-Valencia et al., 2012). Em 2009, Barbosa e colaboradores mostraram que as leptospiros patogênicas são capazes de interagir com C4BP e assim evitam a ativação da via clássica e da via das lectinas do SC. Neste presente trabalho propusemos identificar as regiões de C4BP que interagem com ligantes presentes na membrana de leptospiros patogênicos – LcpA, LigAC e LigBC. Notamos que a ausência dos SCR 7 e SCR 8 de C4BP afeta sua interação com LcpA em 80%, enquanto a interação com a LigBC é afetada em 70% e 40%, respectivamente ($p < 0,05$). Observamos também que a ausência dos SCR4, SCR 7 e SCR 8 de C4BP afeta sua interação com a LigAC em aproximadamente 50%, quando comparado com C4BP íntegra ($p < 0,05$) (Figura 20).

Em 2004, Blom e colaboradores demonstraram que os domínios SCR 1, SCR 2 e SCR 3 da molécula C4BP, localizados na região N-terminal, são responsáveis pela interação desta proteína com o fragmento C4b. Desta forma, essas regiões são necessárias para que a molécula de C4BP exerça sua função de co-fator de FI, o

qual por sua vez irá clivar C4b em C4c e C4d. Cinco anos mais tarde, Kaisa e colaboradores (2009) demonstraram que a C4BP interage com proteínas da matriz extracelular, por meio da sua região C-terminal (localizada próxima à região central - *central core*), deixando, portanto a região N-terminal livre para que ocorra sua interação com C4b e posterior inibição das vias clássica e das lectinas do SC. Neste presente trabalho verificamos que as proteínas recombinantes de leptospiros patogênicas interagem preferencialmente com a extremidade C-terminal das cadeias alfa de C4BP, deixando hipoteticamente a extremidade N-terminal livre para interagir com a proteína C4b e inativar a via clássica e das lectinas do SC. Embora alguns trabalhos demonstrem a importância dos SCRS 1, 6 e 7 na interação com a *Porphyromonas gingivalis* (Potempa et al., 2008) e dos SCRs 2, 5 e 7 na interação com a *Moraxella catarrhalis* (Nordström et al., 2004), resultados semelhantes aos nossos também foram observados em diversos outros patógenos (Agarwal et al., 2012; Ho et al., 2011, 2012) endossando, portanto, a possibilidade dessas bactérias interagirem com a região C-terminal da C4BP para escapar da ativação do SC.

Em 1978, Scharfstein e colaboradores publicaram o primeiro trabalho mostrando a interação de heparina com a molécula de C4BP. A heparina pertence ao grupo dos glicosaminoglicanos (família de polímeros lineares compostos por unidades repetitivas de dissacarídeos) e é estruturalmente similar ao sulfato de heparana, importante componente de matriz extracelular e de membrana celular (Nelson, Cox, 2004; Spijkers et al., 2008). Em 1990, Hessing e colaboradores mostraram que as regiões SCR 1, SCR 2 e SCR 3 das cadeias alfa da molécula de C4BP são importantes para a interação com heparina (Hessing et al., 1990). Desta forma, experimentos de competição utilizando este composto vêm sendo empregados por diversos grupos para confirmar ou descartar a importância das regiões SCR 1, SCR 2 e SCR 3 da molécula de C4BP na interação com proteínas de diversos patógenos (Ho et al, 2011 e 2012; Kirjavainen et al., 2008). Desta forma, empregamos heparina para confirmar se a interação das proteínas LcpA, LigAC e LigBC com a molécula de C4BP seria independente das regiões SCR 1, SCR 2 e SCR 3 localizadas na porção N-terminal da molécula de C4BP (**Figura 21**). Para nossa surpresa, verificamos que a interação entre a molécula de C4BP e as proteínas recombinantes LcpA, LigAC e LigBC foi totalmente abolida na presença de, respectivamente, 0,1mg/mL, 0,2mg/mL e 5mg/mL de heparina ($p < 0,001$). Devido ao fato da heparina se ligar à molécula de C4BP pelas regiões SCR 1, SCR 2 e SCR

3, enquanto as proteínas LcpA, LigAC e LigBC se ligam à molécula de C4BP pelas regiões SCR 4, SCR 7 e SCR 8 perguntamo-nos qual seria o possível motivo da competição entre as proteínas recombinantes de leptospiros patogênicas e a heparina na ligação ao regulador C4BP. Diversos são os trabalhos na literatura que demonstram a interação entre proteínas de membrana de leptospiros patogênicas e componentes de matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina), como possível forma de adesão e infecção celular (Choy et al., 2007; Hauk et al., 2008; Longhi et al., 2009; Oliveira et al., 2011; Viera et al., 2010), entretanto, poucos estudos mostram a interação dessas proteínas de membrana de leptospira com a heparina. Recentemente, o grupo do Dr. Ching observou a interação entre a LigBC com heparina e outras proteínas de matriz extracelular (Ching et al., 2012). Pelo fato da heparina e da C4BP serem capazes de interagir diretamente com a proteína LigBC, perguntamo-nos se não poderia haver competição entre essas moléculas pela interação com a proteína de membrana de leptospiros patogênicas LigBC, o que poderia nos ajudar a entender a inibição da interação de C4BP à LigBC na presença de heparina (**Figura 21**). Para verificar esta hipótese, confirmamos a ligação da proteína LigBC à heparina (Ching et al., 2012) e, neste nosso trabalho, observamos pela primeira vez a interação da LigAC com heparina (**Figura 22**). Investigamos também a ligação da heparina à proteína de membrana de leptospiros patogênicas LcpA por ELISA. Porém, o anticorpo anti-LcpA. Outros anticorpos foram produzidos e serão em breve empregados para esta abordagem. Portanto, estes resultados sugerem que a heparina pode competir com a molécula de C4BP pela interação com as proteínas LigAC e LigBC de leptospiros patogênicas pois, provavelmente, interagem na mesma região da LigAC e LigBC. Uma outra especulação que poderia ser feita diz respeito ao tamanho da heparina, relativamente grande (12 - 15kDa). Uma vez ligada aos domínios SCR 1, SCR2 e SCR 3, a heparina poderia dificultar o acesso de LcpA, LigA ou LigB aos domínios SCR 4, SCR 7 e SCR 8, localizados mais centralmente nesta molécula multimérica.

Outro objetivo deste trabalho foi verificar se a interação entre a C4BP e as proteínas de membrana de leptospiros patogênicas LcpA, LigAC e LigBC seria dependente de forças iônicas. Observamos uma inibição parcial na interação da C4BP com: LcpA - na presença de 400 mM NaCl ($p < 0,05$) - LigAC - na presença de 200 mM e 400 mM de NaCl ($p < 0,05$) - e LigBC - na presença de 100mM de NaCl. A ligação entre a C4BP e a LigBC foi quase totalmente inibida na presença de 200mM

e 400 mM de NaCl ($p < 0,05$) (**Figura 23**). Diversos outros trabalhos verificaram a importância das forças iônicas na interação da C4BP com os seguintes patógenos: *Yersinia enterocolitica* e *Candida albicans* que tiveram sua interação com a C4BP afetada na presença de apenas 100 mM de NaCl (Kirjavainen *et al.* 2008; Luo *et al.*, 2011); *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenza* que apresentou menor interação com a C4BP em 200 mM de NaCl e foi quase totalmente abolida em 400 mM de NaCl (Dieudonné-Vatran *et al.*, 2009; Hallström *et al.*, 2007). Deste modo, nossos resultados apontam a importância das forças iônicas na interação das proteínas de membrana de leptospiros patogênicos LcpA, LigAC e LigBC com a proteína reguladora C4BP.

Para finalizar, utilizamos os diversos mutantes de C4BP (**Figura 16**) para confirmar quais regiões SCR da molécula de C4BP poderiam ser responsáveis pela interação com a superfície de leptospiros patogênicos íntegros, empregando citometria de fluxo (**Figura 25**). Endossando as observações anteriores realizadas com as proteínas recombinantes de leptospiros patogênicos LcpA, LigAC e LigBC, observamos que os domínios SCR 4, SCR 7 e SCR 8 de C4BP também são importantes para a interação deste regulador do SC com a superfície íntegra de leptospiros patogênicos. Estes resultados também confirmam nossa hipótese que a leptospiros patogênica interage com a C4BP em região distinta daquela usada pelo fragmento C4b, tornando possível que a bactéria utilize desta interação como um mecanismo de evasão do SC. Resultados semelhantes foram observados em diferentes patógenos: a interação da *Candida albicans* com a molécula de C4BP é dependente das regiões SCR 4, SCR 7 e SCR 8 da C4BP (Luo *et al.*, 2011); o *Haemophilus influenza* interage com a C4BP pelas regiões SCR 2, SCR 7 e SCR 8 (Hallström *et al.*, 2007) enquanto a interação da *Yersinia pseudotuberculosis* com a C4BP é dependente das regiões SCR 6, SCR 7 e SCR 8 das cadeias alfa desta proteína (Ho *et al.*, 2012). Para nossa surpresa, a deleção do SCR 1 das cadeias alfa da C4BP potencializou a interação deste regulador com a superfície íntegra da bactéria, diferentemente ao observado com os ligantes LcpA, LigAC e LigBC purificados. Devido ao tamanho e à alta complexidade da molécula de C4BP, raros são os estudos que estabelecem a estrutura cristalina desta molécula, porém baseados nos resultados obtidos neste trabalho (**Figura 24**), podemos sugerir que a região SCR 1 das cadeias alfa da C4BP talvez atrapalhe de alguma maneira a interação da C4BP com a superfície de leptospiros patogênicos.

Devido à dificuldades técnicas, apenas um trabalho na literatura empregou a técnica de citometria de fluxo em estudos com *Leptospira* até o momento. Yitzhaki e colaboradores (2004) mostraram que a população de leptospiros incubadas com soro imune contra esta bactéria apresenta alteração no padrão FSC e SSC quando comparadas com a população de leptospira incubada com soro não imune. Dessa forma eles sugeriram substituir o MAT pela técnica de citometria de fluxo no diagnóstico da leptospirose (Yitzhaki et al., 2004). Este presente trabalho é o primeiro a descrever a interação de leptospiros com proteínas de hospedeiros por citometria de fluxo e a padronização desta técnica nos ajudará a entender melhor a interação de *Leptospira* com as demais proteínas do SC.

Outro importante regulador das vias clássica e das lectinas do SC estudado neste trabalho foi o C1INH. Este trabalho descreve pela primeira vez, a interação do C1INH com superfície de leptospiros patogênicos, atenuados e não patogênicos (**Figura 26**). A deposição de C1INH purificado sobre a membrana das diferentes cepas de leptospiros foi maior em leptospiros não patogênicos seguido pela deposição em leptospiros patogênicos e, por último em leptospiros atenuados ($p < 0,01$). Porém, quando empregamos C1INH não purificado, presente no SHN, não observamos diferença significativa ($p > 0,05$) (**Figura 27**) sugerindo, portanto, a presença de outras moléculas no SHN que poderiam inibir, competir ou até mesmo facilitar a interação de C1INH com a membrana destas cepas de leptospira.

Após confirmar a interação do C1INH com diferentes espécies de *Leptospira*, observamos que o C1INH purificado (**Figura 28a**) ou proveniente de SHN (**Figura 28b**) mantém sua função reguladora intacta sendo, portanto, capaz de interagir covalentemente com a proteína C1s e assim, regular a via clássica do SC. Diversos grupos de pesquisa estudam a interação entre proteínas de membrana de patógenos com proteínas reguladoras do SC como estratégia do patógeno para escapar da morte ocorrida pela ativação do SC (Barbosa et al., 2009; Castiblanco-Valencia et al., 2012; Grosskinsky et al., 2010; Meri et al., 2006). Porém, em todos estes trabalhos as bactérias capazes de interagir com as proteínas reguladoras do SC, inibindo sua ativação, são cepas patogênicas e, portanto, resistentes à lise pelo SC. Entretanto, nossos resultados mostram que além da leptospira patogênica (resistente à lise pelo SC) e da leptospira atenuada (parcialmente susceptível à lise pelo SC), a leptospira não patogênica (susceptível à lise pelo SC), também é capaz

de interagir com o C1INH para talvez tentar evadir a ativação da via clássica do SC. A partir destes resultados buscamos melhor entendimento da atuação da via clássica na morte destas espécies de leptospiros para verificar a real importância da interação destas bactérias com o C1INH.

Utilizando soro humano deficiente de C1s (via clássica afetada) ou soro humano deficiente de MBL (via das lectinas afetada, embora ela possa ser ativada pela ação das ficolinas) – nosso grupo demonstrou que a *L. biflexa* (não patogênica) é totalmente susceptível à morte pelo SC e, portanto, sugeriu a importância da ativação da via alternativa na eliminação desta cepa (**Figura 5**) (Barbosa et al., 2009). Neste trabalho, também foi observada a sobrevivência de *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona (atenuada) na presença destes mesmos soros e observamos a importância da ativação da via clássica na morte destas bactérias (**Figura 5**). A fim de confirmar estes resultados empregamos soro humano comercial depletado de FB (via alternativa afetada), para analisar melhor o papel das vias clássica e das lectinas na morte destas bactérias. Sabendo-se que a via clássica é comumente ativada por anticorpos, e assumindo que o soro comercial depletado de FB não apresenta anticorpos específicos para leptospiros, observamos a co-deposição da molécula de C1q e fragmentos de C4 como indício de ativação da via clássica do SC, independente de anticorpos específicos (Albertí et al., 1996; Ehrnthaller et al., 2011) (**Figura 29 e 30**). Após confirmar a ativação da via clássica sobre as bactérias utilizadas neste trabalho, observamos que as leptospiros não patogênicas, atenuadas e patogênicas apresentaram a mesma porcentagem de morte em soro depletado de FB quando comparado com SHN (**Figura 31 e 32**). Dessa forma, concluímos que a interação das leptospiros não patogênicas com o regulador C1INH não representa em si um mecanismo de evasão imune, visto que na presença apenas das vias clássicas e das lectinas a *L. biflexa* se mantém susceptível à morte pelo SC - mesmo padrão de morte encontrada em SHN. Em relação à *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona (atenuada), confirmamos que a ativação apenas da via clássica é suficiente para a morte destas bactérias e confirmamos, novamente, que a *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (patogênica) é resistente à morte pelo SC.

Sabendo que apenas as vias clássica e das lectinas são suficientes para eliminar a leptospiros atenuada e que esta bactéria é capaz de interagir com C1INH, realizamos experimento de sobrevivência utilizando soro humano deficiente de

C1INH (proveniente de pacientes previamente diagnosticados com HAE). Após incubação da cepa patogênica com o soro deficiente de C1INH, verificamos um perfil de morte semelhante ao observado com SHN, ou seja, as bactérias apresentaram 100% de sobrevivência (**Figura 33**). Este resultado indica que a presença de C1INH não é essencial para a sobrevivência desta bactéria frente à ação do SC. Em outras palavras, esta cepa mantém a capacidade de evadir à ação do SC independente da interação com o C1INH (**Figura 33**), provavelmente pela sua capacidade de interação com C4BP que pode estar presente em concentrações aumentadas no soro dos pacientes com HAE (Varga et al., 2008). A sobrevivência da cepa não patogênica na presença de soro deficiente de C1INH foi maior quando comparada com a sobrevivência em SHN ($p<0,0001$) (**Figura 33**). Embora a via alternativa desses pacientes se apresente intacta, a via das lectinas está levemente comprometida (Varga et al., 2008) e, provavelmente, essa diferença pode ter ocasionado uma maior sobrevivência da leptospira não patogênica. Porém, ao reconstituirmos o soro desses pacientes com diferentes quantidades de C1INH observamos uma diminuição na sobrevivência dessa bactéria que se assemelhou a sobrevivência observada em SHN (**Figura 34**). Um possível motivo para a sobrevivência desta bactéria diminuir à medida que suplementamos o soro de pacientes com HAE com o regulador C1INH pode ser explicado se analisarmos o papel deste regulador na estabilização do complexo C1 (conforme abordado no item 1.3.1.5.2 deste trabalho). Possivelmente o C1INH purificado adicionado ao soro de pacientes com HAE pode interagir com o complexo C1 ajudando, provavelmente, sua estabilização e, portanto, a ativação da via clássica do SC. Uma maior ativação da via clássica poderia auxiliar na morte dessas bactérias desta forma a porcentagem de morte neste soro se assemelha à observada em SHN. Dessa forma, experimentos adicionais são necessários para melhor entendimento do papel do C1INH na sobrevivência de leptospiros não patogênicos. Para confirmar esta hipótese, quantificaremos a ativação hemolítica mediada pela via clássica do soro desses pacientes com HAE, na ausência e na presença de diferentes quantidades de C1INH purificado.

Diferentemente da leptospira não patogênica, a leptospira atenuada apresentou menor sobrevivência na presença de soro deficiente de C1INH, embora a ativação da via clássica neste soro esteja comprometida ($p<0,0001$) (**Figura 33**). Após reconstituirmos este soro com diferentes concentrações de C1INH observamos maior sobrevivência destas bactérias (**Figura 34**). Este resultado sugere que, embora a

atividade hemolítica mediada pela via clássica esteja diminuída neste soro, ela é suficiente para eliminar a leptospira atenuada e, uma vez que a interação da leptospira atenuada com o C1INH é um importante mecanismo de evasão ao SC, quando esta bactéria é incubada com soro deficiente deste regulador ela se torna mais susceptível à morte. Desta forma, nosso resultado sugere que no caso da leptospira atenuada a sua interação com o C1INH é um importante mecanismo de evasão imune ao SC.

Este trabalho abordou a importância dos dois principais reguladores das vias clássica e das lectinas do SC – C4BP e C1INH – na eliminação de *Leptospira* spp. Em relação à C4BP, aprofundamos os estudos de interação com as proteínas recombinantes de leptospiros patogênicas (LcpA, LigAC e LigBC), bem como sua interação com a superfície íntegra de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm. Observamos que essas interações são dependentes de forças iônicas e afetadas pela presença de heparina. Observamos também a importância das regiões SCR 4, SCR 7 e SCR 8 das cadeias alfa da molécula de C4BP na interação com a *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm. Demonstramos, pela primeira vez, a interação de leptospira não patogênica com C1INH, porém esta interação não é suficiente para proteger a bactéria da lise pelo SC. Verificamos também a importância do regulador C1INH na sobrevivência da leptospira atenuada, uma vez que na ausência deste regulador a sobrevivência da leptospira diminuiu significativamente. Em relação à leptospira patogênica, nossos resultados indicam a importância da interação à C4BP para escapar da ação do SC enquanto sua interação com o C1INH aparenta ser um mecanismo secundário para a sobrevivência desta bactéria no hospedeiro.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho observamos:

- Que os domínios SCR 7 e SCR 8 de C4BP são importantes para a sua interação com as proteínas LcpA, LigA e LigB. Além disso, o SCR 4 tem um papel relevante para a ligação de C4BP em LigA;
- A ligação entre as proteínas recombinantes de *L. interrogans* - LcpA, LigAC e LigBC - e a mutante de C4BP é dependente de forças iônicas;
- Que as proteínas recombinantes LigA e LigB ligam-se diretamente à heparina. Esta interação dificulta a ligação dessas mesmas proteínas bacterianas à C4BP na presença de heparina;
- O C1INH interage com a superfície de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (patogênica), *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona (atenuada) e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica). Uma vez ligado à superfície destas bactérias, o C1INH mantém sua função reguladora intacta, observada pela formação do complexo C1INH/C1s.
- A via clássica do SC pode ser ativada sobre a *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona (atenuada), *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (patogênica) e *L. biflexa* sorovar Patoc estirpe Patoc I (não patogênica) de maneira independente da presença de anticorpos específicos.
- As vias clássica e das lectinas são importantes para a morte da *L. biflexa* (não patogênica) e *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona (atenuada).
- A interação de C1INH com *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe Pomona (atenuada) parece ter grande importância para a sobrevivência desta bactéria podendo, portanto, representar um importante mecanismo de evasão das vias clássica e das lectinas do SC.

REFERÊNCIAS*

- Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. 560 p.
- Adler B, Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. Overview of the biology of *Leptospira* and how recent progress in genetic research will contribute to our understanding of *Leptospira* pathogenesis. *Vet Microbiol*. 2010;140(3–4):287–96.
- Agarwal V, Hammerschmidt S, Malm S, Bergmann S, Riesbeck K, Blom AM. Enolase of *Streptococcus pneumoniae* Bind Human Complement Inhibitor C4b-Binding Protein and Contributes to Complement evasion. *J Immunol*. 2012;189:3575-84.
- Albertí S, Marqués G, Camprubí S, Merino S, Tomás JM, Vivanco F, Benedí VJ. C1q Binding and Activation of the Complement Classical Pathway by *Klebsiella pneumoniae* Outer Membrane Proteins. *Infect Immun*. 1993;61(3):852-60.
- Alitalo A, Meri T, Ramo L, Jokiranta TS, Heikkilä T, Seppälä IJ, Oksi J, Viljanen M, Meri S. Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation. *Infect Immun*. 2001;69:3685-91.
- Andrade L, Daher EF, Seguro AC. Leptospiral nephropathy. *Semin Nephrol*. 2008;28:383-94.
- Barbosa AS, Abreu PA, Vasconcellos SA, Moraes ZM, Gonçalves AP, Silva AS, Dahan MR, Isaac L. Immune evasion of *Leptospira* spp. by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect Immun*. 2009;77:1137-43.
- Barbosa AS, Monaris D, Silva LB, Moraes ZM, Vasconcellos SA, Cianciarrullo 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(7):3207-16.
- Barrington R, Zhang M, Fischer M, Carroll MC. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2001;180:5–15.
- Beinrohr L, Dobó J, Závorszky P, Gál P. C1, MBL–MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation. *Trends Mol Med*. 2008;14(12):511-21.
- Benschop J, Heuer C, Jaros P, Collins-Emerson J, Midwinter A, Wilson P. Sero-prevalence of leptospirosis in workers at a New Zealand slaughterhouse. *N Z Med J*. 2009;122(1307):39–47.

*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.

Bergamaschini L, Miedica A, Cicardi M, Coppola R, Faioni EN, Agostoni A.. Consumption of C4b-binding protein (C4BP) during in vivo activation of the classical complement pathway. *Clin Exp Immunol.*1999;116:220–4.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(12):757–71.

Blom AM. Structural and Functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(6):978-82.

Blom AM, Kask L, Dahlbäck B. CCP1-4 of the C4b-binding protein alfa-chain are required for factor I mediated cleavage of C3b. *Mol Immunol.* 2003;39:547–56.

Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Complement inhibitor C4b-binding protein—friend or foe in the innate immune system? *Mol Immunol.* 2004;40:1333–46.

Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Functions of human complement inhibitor C4b-binding protein in relation to its structure. *Arch Immunol Ther Exp.* 2004;52:83–95.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia Leptospirose: Diagnóstico e Manejo Clínico/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009. [citado em 18 de janeiro de 2014]. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/ZOO/LEPTO09_GUIA_MANEJO.pdf

Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. Nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49:839-58.

Bordet J. Les leukocytes et les proprietes actives du serum chez les vaccines. *Ann Inst Pasteur.* 1895;9:462–506.

Bordet J. Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouge par le sérum d'animaux injecteies de sang defibiné. *Ann Inst Pasteur.* 1898;12:688.

Budayova-Spano M1, Lacroix M, Thielens NM, Arlaud GJ, Fontecilla-Camps JC, Gaboriaud C. The crystal structure of the zymogen catalytic domain of complement protease C1r reveals that a disruptive mechanical stress is required to trigger activation of the C1 complex. *EMBO J.* 2002;21(3):231-9.

Caliezi C, Wuillemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE. C1-Esterase Inhibitor: An Anti-Inflammatory Agent and Its Potential Use in the Treatment of Diseases Other Than Hereditary Angioedema. *Pharmacol Rev.* 2000;52:91-112.

Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Bezerra da Silva L, 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. *J Infec Dis.*2012;205:995-1004.

Chen CH, Boackle RJ. A Newly Discovered Function for C1 Inhibitor, Removal of the Entire C1qr2s2 Complex from Immobilized Human IgG Subclasses. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;87:68–74.

Ching ATC, Fávaro RD, Lima SS, Chaves AAM, Lima MA, Nader HB, Abreu PAE, Ho PL. *Leptospira interrogans* shotgun phage display identified LigB as a heparin-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;427:774–9.

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.

Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global Analysis of outer membrane Proteins from *Leptospira interrogans* Serovar Lai. *Infect Immun*. 2002;70(5):2311-8.

Daha MR, Van Es LA. Relative resistance of the F-42-stabilized classical pathway C3 convertase to inactivation by C4-binding protein. *J Immunol*. 1980;125:2051-54

Dalmasso AP, Falk RJ, Raji L. The pathobiology of the terminal complement complexes. *Complement Inflamm*. 1989;6:36–48.

De Paula PF, Barbosa JE, Junior PR, Ferriani VPL, Latorre MRDO, Nudelman V, Isaac L. Ontogeny of Complement Regulatory Proteins – Concentrations of Factor H, Factor I, C4b-Binding Protein, Properdin and Vitronectin in Healthy Children of Different Ages and in Adults. *Scan J Immunol*. 2003;58,572–7.

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

Desai S, Van Treeck U, Lierz M, et al. Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospiroses among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. *Clin Infect Dis*. 2009;48(6):691-7.

Dieudonné-Vatran A, Krentz S, Blom AM, Meri S, Henriques-Normark B, Riesbeck K, Albiger B. Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* bind the complement inhibitor C4b-binding protein in a PspC allele-dependent fashion. *J Immunol*. 2009;182(12):7865-77.

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

Ehlich P, Morgenroth J. Zur Theorie der Lysenwirkung. *Berlin Klin Wchschr*. 1899;36:6.

Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Lang MH. New Insights of an Old Defense System: Structure, Function, and Clinical Relevance of the Complement System. *Mol Med*. 2011;17(4):317-29.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and *Leptospirosis*. 2^a ed. Melbourne: MediSci; 1999. 272 p.

Ferreira A, Takahashi M, Nussenzweig V. Purification and characterization of mouse serum protein with specific binding affinity for C4 (Ss protein). *J Exp Med*. 1977;146(4):1001–18.

Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. *Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement System*. *Scan J Immunol*. 2010;73:408–19.

Fraga TR, Courrol DD, 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*. 2013;21. [ahead of print].

Fujita T, Gigli I, Nussenzweig V. Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. *J Exp Med*. 1978;148:1044–51.

Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol*. 2004;41:1089–98.

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

Gewurz H, Ying SC, Jiang H, Lint TF. Nonimmune activation of the classical complement pathway. *Behring Inst Mitt*. 1993;93:138–47.

Ghannam A, Defendi F, Charignon D, Csopaki F, Favier B, Habib M, Cichon S, Drouet C. Contact system activation in patients with HAE and normal C1 inhibitor function. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2013;33(4):513-33.

Grosskinsky S, Schott M, Brenner C, Cutler SJ, Simon MM, Wallich R. Human complement regulators C4b-binding protein and C1 esterase inhibitor interact with a novel outer surface protein of *Borrelia recurrentis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(6):698.

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

Hallström T, Jarva H, Riesbeck K, Blom AM. Interaction with C4b-binding protein contributes to nontypeable *Haemophilus influenzae* serum resistance. *J Immunol*. 2007;178(10):6359-66.

Happonen KE, Sjöberg AP, Mörgelin M, Heinegård D, Blom AM. Complement Inhibitor C4b-Binding Protein Interacts Directly with Small Glycoproteins of the Extracellular Matrix. *J Immunol*. 2009;182:1518-25.

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

Hauk P, Macedo F, Romera EC, Vasocncellos SA, de Moraes ZM, Barbosa AS, Ho PL. LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect Immun*. 2008;76:2642-50.

Hein E, Honore C, Skjoedt MO, Munthe-Fog L, Hummelshøj T, Garred P. Functional Analysis of Ficolin-3 Mediated Complement Activation. *PLoS One*. 2010;5(11):e15443.

Hepburn NJ, Ruseva MM, Harris CL, Morgan BP. Complement roles in renal disease and modulation for therapy. *Clin Nephrol*. 2008;70(5):357-76.

Ho DK, Tissari J, Jarvinen HM, Blom AM, Meri S, Jarva H. Functional Recruitment of Human Complement Inhibitor C4b-Binding Protein to Outer Membrane Protein Rck of *Salmonella*. *PLoS One*. 2011;6(11):e27546.

Ho DK, Riva R, Kirjavainen V, Jarva H, Ginström E, Blom AM, Skurnik M, Meri S. Functional Recruitment of the Human Complement Inhibitor C4BP to *Yersinia pseudotuberculosis* Outer Membrane Protein Ail. *J Immunol*. 2012;188:4450-9.

Hsu D, Shaker M. An update on hereditary angioedema. *Curr Opin Pediatr*. 2012;24:638–46.

Ho DK, Riva R, Skurnik M, Meri S. The *Yersinia pseudotuberculosis* Outer Membrane Protein Ail Recruits the Human Complement Regulatory Protein Factor H. *J Immunol* 2012;189:3593-99.

Inada R, Ido Y, Hoke R, Kaneko R, Ito H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaetosis Icterohaemorrhagica*). *J Exp Med*. 1916;23(3):377-402.

Instituto Pasteur. 2007. [citado em 18 jan. 2014]. Disponível em: <http://www.pasteur.jp/press/cp2007/cp20070712e.html>

James K. Mechanism of the nonspecific immune response. In: *Clinical Immunology. Principles and laboratory diagnosis*. 1997:33-53.

Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature*. 2003;421(6921):388-92.

Khairani-Bejo S, Bahaman AR, Zamri-Saad M, Mutalib AR. The survival of *Leptospira interrogans* serovar hardjo in the Malaysian Environment. *J Anim Vet Adv*. 2004;3(3):123-9.

Kirjavainen V, Jarva H, Biedzka-Sarek M, Blom AM, Skurnik M, Meri S. *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog.* 2008;4(8):e1000140.

Kobayashi Y. Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. *J Infect Chemother.* 2001;7:10–5.

Kolev M, Friec G, Kemper C. The role of complement in CD4+ T cell homeostasis and effector functions. *Semin Immunol.* 2013;25:12-9.

Kraiczy P, Skerka C, Kirschfink M, Zipfel PF, Brade V. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: Insufficient killing of the pathogens by complement and antibody. *Int J Med Microbial.* 2002;291(33):141-6.

Kuhn S, Skerka C, Zipfel PF. Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J Immunol.* 1995;155:5663-70.

Lacroix-Lamadé S, D'Andon MF, Michel E, Ratet G, Philpott DJ, Giardin SE, Boneca IG, Vandewalle A, Werts C. Downregulation of the Na/K-ATPase pump by leptospiral glycolipoprotein activates the NLRP3 inflammasome. *J Immunol.* 2012;188(6):2805-14.

Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(2):132-42.

Lathem WW, Grys TE, Witowski SE, Torres AG, Kaper JB, Tarr PI, Welch RA. StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol Microbiol.* 2002;45(2), 277–88.

Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol.* 2001;14:296-326.

Longhi MT, Oliveira TR, Romero EC, Goncales AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. *J Med Microbiol.* 2009;58:1275-82.

Luo S, Blom AM, Rupp S, Hipler UC, Hube B, Skerka C, Zipfel PF. The pH-regulated antigen 1 of *Candida albicans* binds the human complement inhibitor C4b-binding protein and mediates fungal complement evasion. *J Biol Chem.* 2011 11;286(10):8021-9.

Malm J, Bennhagen R, Holmber L, Dahlback B. Plasma concentrations of C4b-binding protein and vitamin k-dependente proteins S in term and preterm infants: low lwwls of proteins S-C4b-binding proteins complexes. *Br J Haematol.* 1988;68(4):445-9.

Mandal MN, Ayyagari R. Complement factor H: spatial and temporal expression and localization in the eye. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(9):4091-4097.

Marder SR, Chenoweth DE, Goldstein IM, Perez HD. Chemotactic responses of human peripheral blood monocytes to the complement derived peptides C5a and C5a des Arg. *J Immunol*. 1985;134:3325–31.

Marr N, Shah NR, Lee R, Kim EJ, Fernandez RC. Bordetella pertussis autotransporter vag8 binds human C1 esterase inhibitor and confers serum resistance. *PLoS One*. 2011;6(6):e20585.

Matsushita M, Endo Y, Fujita T. Cutting edge: complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol*. 2000;164:2281–4.

Matsushita M, Fujita T. Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol Ver*. 2001;180:78–85.

McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2005;18(5):376-86.

Meri T, Blom AM, Hartmann A, Lenk D, Meri S, Zipfel PF. The hyphal and yeast forms of *Candida albicans* bind the complement regulator C4b-binding protein. *Infect Immun*. 2004;72(11):6633-41.

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

Michna SW. Leptospiroses. *Vet Rec*. 1970;86:484-96.

Morgan BP, Harris CL. Complement regulatory proteins. London: Academic Press; 1999. 382 p.

Morley JB, Walport MJ. The Complement FactsBook. London: Academic Press; 2000. 240 p.

Murgia R, Garcia R, Cinco M. *Leptospire*s are killed in vitro by both oxygen-dependent and independent reactions. *Infect Immun*. 2002;70(12):7172-5.

Nelson DL, Cox MM. Principles of biochemistry. 4th ed. New York: W.H. Freeman; 2004. 1100 p.

Ngampasutadol J, Ram S, Blom AM, Jarva H, Jerse AE, Lien E, Goguen J, Gulati S, Rice PA. Human C4b-binding protein selectively interacts with *Neisseria gonorrhoeae* and results in species-specific infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(47):17142-7.

Noguchi H. Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira* (Spirochaeta) icterohaemorrhagiae (Inada and Ido). *J Exp Med*. 1918;27:575–92.

Nordström T, Blom AM, Forsgren A, Riesbeck K. The emerging pathogen *Moraxella catarrhalis* interacts with complement inhibitor C4b binding protein through ubiquitous surface proteins A1 and A2. *J Immunol*. 2004;173(7):4598-606.

Nuijens JH, Eerenberg-Belmer AJM, Huijbregts CC, Schreuder WO, Felt-Bersma RJ, Abbink JJ, Thijs LG, Hack CE. Proteolytic inactivation of plasma C1 inhibitor in sepsis. *J Clin Invest.* 1989;84:443-50.

Nuttall G. Experimente über die bakterienfeindliche Einflüsse des tierischen Körpers. *Z Hyg Infect ionskir.* 1988;4:353.

Oliveira R, de Moraes ZM, Goncales AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL. Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PLoS One.* 2011;6(7):e21962.

Pandiripally V, Gregory E, Cue D. Acquisition of Regulators of Complement Activation by *Streptococcus pyogenes* Serotype M1. *Infect Immun.* 2002;70(11):6206–14.

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-independent antibody responses. *J Exp Med.* 1974;140:126–45.

Pepys MB. Studies in vivo of cobra factor and murine C3. *Immunology.* 1975;28(2):369-77.

Potempa M1, Potempa J, Okroj M, Popadiak K, Eick S, Nguyen KA, Riesbeck K, Blom AM. Binding of complement inhibitor C4b-binding protein contributes to serum resistance of *Porphyromonas gingivalis*. *J Immunol.* 2008;15;181(8):5537-44.

Prodinger WM. Complement receptor type two (CR2, CR21): a target for influencing the humoral immune response and antigen-tapping. *Immunol Res.* 1999;20(3):187-94.

Reid KMB. C1q and mannose-binding lectin. In: Volanakis JEF, Frank MM. *The human complement system in health and disease.* New York: Marcel Dekker; 1998. p. 33-48.

Reis ES, Barbuto JA, Issac L. Complement components, regulators and receptors are produced by human monocyte-derived dendritic cells. *Immunobiology.* 2007;212:151-7.

Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM, Santana FS, Mohr S, et al. Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(4):e228.

Salvesen GS, Catanese JJ, Kress LF, Travis J. Primary structure of the reactive site of human C1-inhibitor. *J Biol Chem.* 1985;260(4):2432-6.

Sánchez-Corral P, Garcia OC, Cordoba SR. Isoforms of Human C4b-binding Protein I. Molecular Basis for the C4BP Isoform Pattern and Its Variations in Human Plasma. *J Immunol.* 1995;155:4030-6.

Schapira M, de Agostini A, Schifferli JA, Colman RW. Biochemistry and pathophysiology of human C1 inhibitor: current issues. *Complement*. 1985;2:111–26.

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

Schumacher WA, Fantone JC, Kunkel SE, Webb RC, Lucchesi BR. The anaphylatoxins C3a and C5a are vasodilators in the canine coronary vasculature in vitro and in vivo. *Agents Actions*. 1991;34:345–49.

Schwab J, Hammerschmidt C, Richter D, Skerka C, Matuschka FR, Wallich R, Zipfel PF, Kraiczy P. *Borrelia valaisiana* Resist Complement-Mediated Killing Independently of the Recruitment of Immune Regulators and Inactivation of Complement Components. *PLoS One*. 2013;8(1):e53659.

Sim RB, Arland GJ, Colomb MG. C1 inhibitor depend dissociation on human complement component C1 bound to the immune complex. *Biochem J*. 1979;179:449-57.

Sim RB. Complement classical pathway. In: Roitt IM, Delves PJ. *Encyclopedia of immunology*. London: Academic. Press; 1998. p. 373-77.

Soruri A, Riggert J, Schlott T, Kiafard Z, Dettmer C, Zwirner J. Anaphylatoxin C5a induces monocyte recruitment and differentiation into dendritic cells by TNF-alpha and prostaglandin E2-dependent mechanisms. *J Immunol*. 2003;171:2631–6.

Spijkers PP, Denis CV, Blom AM, Lenting PJ. Cellular uptake of C4b-binding protein is mediated by heparan sulfate proteoglycans and CD91/LDL receptor-related protein. *Eur J Immunol*. 2008;38(3):809-17.

Tarze MD, Hickey A, Forster T, Mohammadi M, Longhurst H. An evaluation of tests used for the diagnosis and monitoring of C1 inhibitor deficiency: normal serum C4 does not exclude hereditary angioedema. *Clin Exp Immunol*. 2007;149:513–6.

Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol*. 2006;176:1305–10.

Varga L, Széplaki G, Laki J, Kocsis A, Kristóf K, Gál P, Bajtav Z, Wieslander J, Daha MR, Garred P, Madsen HO, Fust G, Farkas H. Depressed activation of the lectin pathway of complement in hereditary angioedema. *Clin Exp Immunol*. 2008;153:68–74.

Vieira ML, de Moraes ZM, Goncales AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL. Lsa63, a newly identified surface proteins of *Leptospira interrogans* that binds laminin and collagen IV. *J Infect*. 2010;60:52-64.

Vinh T, Adler B, Faine S. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extract from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. *J Gen Microbiol*. 1986;132:103-9.

Vogl G, Lesiak I, Jensen DB, Perkhofer S, Eck R, Speth C, Lass-Flörl C, Zipfel PF, Blom AM, Dierich MP, Würzner R. Immune evasion by acquisition of complement inhibitors: the mould *Aspergillus* binds both factor H and C4b binding protein. *Mol Immunol*. 2008;45(5):1485-93.

Volanakis JE. Overview of the complement system. In: Volanakis JE, Frank MM. Marcel Dekker. The human complement system in health and disease. New York: Informa Healthcare; 1998. p. 672.

Ziccardi RJ. A new role for C-1-inhibitor in homeostasis: control of activation of the first component of human complement. *J Immunol*. 1982;128(6):2505-8.

Ziccardi RJ, Dahlbäck B, Müller-Eberhard HJ. Characterization of the interaction of human C4b-binding protein with physiological ligands. *J Biol Chem*. 1984;259:13674-9.

Ziccardi RJ. Demonstration of the interaction of native C1 with monomeric immunoglobulins and C1 inhibitor. *J Immunol*. 1985;134(4):2559-63.

Zingale LC, Castelli R, Zanichelli A, Cicardi M. Acquired Deficiency of the Inhibitor of the First Complement Component: Presentation, Diagnosis, Course, and Conventional Management. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2006;26:669-90.

Walport MJ. Complement. First of two parts. *N. Engl. J. M*. 2001;344(14):1058-1066.
Wang B, Sullivan J, Sullivan GW, Mandell GL. Interaction of leptospira with human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun*. 1984;44(2):459-64.

Wang B, Sullivan J, Sullivan GW, Mandell GL. Role of specific antibody in interaction of leptospira with human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun*. 1984;46(3):809-13.

Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*. 2001;2:346-52.

Wong NKH, Kojima M, Dobó J, Ambrus G, Sim RB. Activities of the MBL-associated serine proteases (MASPs) and their regulation by natural inhibitors. *Mol Immunol*. 1999;36:853.

Woodward MJ. Leptospira. *Molecular Medical Microbiology*. 2001;8:2138-54.

World Health Organization. Leptospirosis worldwide, 1999. *Wkly Epidemiol Rec*. 1999;74(29):237-42.

World Health Organization. Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. [citado em 18 jan. 2014]. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf