JULIA AVIAN VASSALAKIS

**O PAPEL DO COMPONENTE C3 DO SISTEMA COMPLEMENTO
NA INFECÇÃO *IN VIVO* POR *LEPTOSPIRA INTERROGANS***

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Lourdes Isaac

Versão Original

São Paulo
2017

RESUMO

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

O Sistema Complemento é parte da resposta imune inata e é de suma importância para a eliminação de processos infecciosos e para garantir a homeostase. A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira*. Essas bactérias invadem o organismo pela pele lesionada ou mucosas após contato direto ou indireto com a urina de roedores, invadindo a corrente sanguínea até atingir órgãos como fígado, pulmão, baço e rim. Neste trabalho investigamos a importância da proteína C3 do SC na infecção *in vivo* por *L. interrogans*. Foram empregados camundongos C57BL/6 deficientes da proteína C3 (B6.C3^{-/-}) e como controle camundongos congênicos (B6.C3^{+/+}) infectados com a bactéria *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (LPF). Observamos que a deficiência da proteína C3 causa uma falha na resposta imunológica, causando uma diminuição da proliferação celular de monócitos, neutrófilos, linfócitos B, linfócitos T CD4 e T CD8 no baço. Essa falha da proliferação celular tem como consequência uma diminuição da resposta inflamatória, dificultando a eliminação bacteriana dos principais órgãos-alvo (fígado, rim, pulmão e baço) nos primeiros dias de infecção. A diminuição da proliferação celular no baço dos camundongos B6.C3^{-/-} pôde ser observada na circulação periférica, onde não foi encontrado um número significativamente alto no terceiro dia de infecção como foi observado nos camundongos selvagens, aumentando apenas no sexto dia de infecção. Apesar dos camundongos deficientes de C3 apresentarem uma capacidade menor de eliminação da LPF nos dias iniciais de infecção, ao sexto dia os camundongos foram capazes de eliminar a LPF de seus órgãos alvo, apesar de ainda apresentarem números mais elevados de bactéria quando comparados com os camundongos selvagens. Essa falha da eliminação da carga bacteriana demonstrou ter consequências em fases mais tardias da doença, principalmente no rim, onde observamos o aparecimento de nefrite intersticial apenas nos camundongos deficientes de C3. Na análise histopatológica, observamos que a proteína C3 ajudou a desencadear um processo inflamatório mais intenso no fígado, desenvolvendo necrose e áreas maiores de infiltrados leucocitários, visto em menor intensidade nos camundongos deficientes de C3. A eliminação das leptospirosas pode ocorrer pela urina dos hospedeiros. Nossos dados mostraram que os camundongos eliminam as bactérias pela urina na fase mais tardia da infecção, após seis dias e que os camundongos deficientes possuem um número maior de LPF sendo eliminada do que os camundongos selvagens nesse momento da infecção. Nosso trabalho foi capaz de demonstrar que a proteína C3, principalmente nos dias iniciais da infecção, é importante para montar uma resposta inflamatória apropriada para combater a infecção por LPF e eliminar a bactéria do organismo.

Palavras-chave: *Leptospira*. C3. Sistema Complemento. Infecções bacterianas.

ABSTRACT

Vassalakis JA. The role of Complement System component C3 during *in vivo* infection by *Leptospira interrogans*. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

The Complement System is part of the innate immune response and is of paramount importance for the elimination of infectious diseases and to guarantee homeostasis. Leptospirosis is a zoonosis caused by bacteria of the genus *Leptospira*. These bacteria invade the body through the injured skin or mucous membranes after direct or indirect contact with the urine of rodents, invading the bloodstream until reach organs such as liver, lung, spleen and kidney. In this work, we investigated the importance of the Complement protein C3 in the *in vivo* infection by *L. interrogans*. C57BL/6 mice deficient in C3 protein (B6.C3^{-/-}) and, as control, congenic mice (B6.C3^{+/+}) infected with *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki strain Pomona Fromm (LPF) were used. We observed that deficiency of C3 protein causes a failure of the immune response, causing a decrease in the cellular proliferation of monocytes, neutrophils, B lymphocytes, T CD4 and T CD8 lymphocytes in the spleen. This failure of cell proliferation results in a decrease in the inflammatory response, making it difficult to eliminate the bacteria from the main target organs (liver, kidney, lung and spleen) in the first days of infection. The decrease in cell proliferation in the spleen of the B6.C3^{-/-} mice could be observed in the peripheral circulation, where no significant number was found on the third day of infection as observed in the wild type mice, increasing only on the sixth day of infection. Although the C3-deficient mice had a lower LPF elimination capacity on the initial days of infection, mice were able to eliminate the LPF from their target organs on the sixth day, although they still had higher numbers of bacteria when compared to the wild type animals. This failure of elimination of bacterial load has been shown to have consequences in later stages of the disease, especially in the kidney, where we observed the appearance of interstitial nephritis only in C3-deficient mice. In the histopathological analysis, we observed that the C3 protein triggered an intense inflammatory process in the liver, developing necrosis and larger areas of leukocyte infiltrates, seen in a lower intensity in C3 deficient mice. The elimination of leptospires can occur through the urine of the hosts. Our data showed that the mice eliminate the bacteria by the urine in the later phase of the infection after six days and that the C3-deficient mice have a larger number of LPF being eliminated than the wild type mice at that time of the infection. Our work has been able to demonstrate that C3 protein, especially in the early days of infection, is important in assembling an appropriate inflammatory response to fight LPF infection and eliminate the bacteria in the body.

Keywords: *Leptospira*. C3. Complement System. Bacterial infections.

1 Introdução

1.1 Sistema Complemento

A entrada de agentes agressores no organismo desencadeia a primeira linha de defesa do hospedeiro denominada imunidade inata, a qual consiste em uma resposta imediata de células e moléculas ao estímulo, a partir de mecanismos previamente estabelecidos a esses elementos e que, ao final dessa resposta, não estabelece memória imunológica, diferentemente da resposta adaptativa ou adquirida. Entre os principais elementos da imunidade inata estão: as barreiras físicas e químicas, as células efetoras (macrófagos, neutrófilos, células *Natural Killer* e células dendríticas e as proteínas que formam o Sistema Complemento (SC). Tais elementos são responsáveis pela ativação da resposta imunológica que ocorre após o reconhecimento de padrões moleculares presentes apenas em microorganismos, os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), como os *Toll-like receptors* (TLRs). Após o reconhecimento, são desencadeados mecanismos capazes de combater diversos tipos de patógenos, como a fagocitose, ativação do SC e a produção de citocinas, incluindo quimiocinas. (Cruvinel et al., 2010).

O SC foi descoberto em 1889 como um componente termo lábil presente no sangue com capacidade de lisar hemácias de espécies não humanas, além de possuir características bactericidas (Buchner, 1889). É constituído por proteínas solúveis e de membrana que fazem parte da resposta inata, porém também participa como um mecanismo efetor da resposta humoral. As proteínas solúveis do SC são encontradas na sua forma não ativada e, após uma série de ativações enzimáticas por três vias distintas, disparam uma cascata na superfície do patógeno com o objetivo de eliminar a infecção por meio de opsonização e posterior fagocitose, pela ação das anafilotoxinas que atraem células inflamatórias e pela formação do seu complexo de ataque à membrana (MAC) que pode causar a lise osmótica do patógeno (Nesargikar et al., 2012; Norris, Remuzzi, 2013). Além da resposta contra infecções por microrganismos, o SC também participa da remoção de imunocomplexos detritos de células necróticas e apoptóticas (Sjöberg et al., 2009).

A ativação do SC pode ocorrer por três vias (**Figura 1**): a Via Clássica, que pode ser ativada a partir da ligação do complexo C1 a imunocomplexos; a Via Alternativa, que se inicia após a hidrólise espontânea da ligação tiól-éster da molécula C3; e a Via das Lectinas, que é ativada pela ligação de lectinas, como a lectina ligadora de manose (MBL – *mannose-binding lectin*) e ficolinas, a resíduos de carboidratos e N-acetilglicosamina de patógenos, respectivamente (Nangaku, 1998). Apesar das diferentes formas de ativação, as três vias do SC

originam C3-convertases e C5-convertases e, ao final de cada uma das vias, poderá haver a formação do MAC, que participa ativamente da destruição de patógenos (Nesargikar et al., 2012).

Figura 1 – As três vias de ativação do SC e a formação do MAC. A Via Clássica é ativada a partir da ligação do complexo C1 a um imunocomplexo. A Via das Lectinas é ativada a partir da ligação da MBL ou ficolinas a carboidratos e N-acetilglicosamina de patógenos, respectivamente. A ativação de ambas as vias tem como resultado a clivagem de C4 e C2. A Via Alternativa inicia a partir da hidrólise espontânea da molécula C3. Todas as vias de ativação geram as C3- e C5- convertases, esta última dará início à formação do complexo de ataque à membrana (MAC), responsável pela lise celular (Modificada de Walport, 2001).

1.1.1 Via Clássica

A Via Clássica do SC é iniciada, principalmente, a partir da ligação do complexo C1 a um complexo antígeno-anticorpo (Ehrlich, Morgenroth, 1900). O complexo C1 é formado por uma molécula de C1q, duas de C1r e mais duas de C1s. C1q se liga à porção Fc de anticorpos IgM ou IgG e ativa C1r, que por sua vez, cliva e ativa C1s (Ziccardi, 1983; Reid, 1986), a qual é capaz de clivar as moléculas C4 e C2, ativando-as e dando continuidade a cascata enzimática. A clivagem de C4 dá origem a dois fragmentos, um maior C4b, que permanece ligado covalentemente à superfície do patógeno, e um menor C4a (Law, Dodds, 1990). C2 ligado ao fragmento C4b é clivado por C1s em C2a e C2b (Nagasawa, Stroud, 1977), formando a C3-convertase da Via Clássica (C4bC2a) capaz de clivar várias moléculas de C3 em C3a, uma potente anafilotoxina e C3b, uma opsonina que pode se ligar a C3-convertase e formar a C5-convertase da Via Clássica (C4bC2aC3b) (Takata et al., 1987; Kozono et al., 1990). C5 é clivado em C5a (anafilotoxina) e C5b, a partir do qual iniciar-se-á a formação do MAC (Loos, 1985).

Além de ser ativada pela ligação de C1 a um imunocomplexo, a Via Clássica também é iniciada pelo reconhecimento da Proteína C-reativa (CRP) pela molécula de C1q durante processos inflamatórios quando ligada a um ligante multivalente (Kaplan, Volanakis, 1974). Essa proteína produzida pelo fígado possui uma ligação dependente de Ca^{2+} para fosfolipinas expressa na superfície de diversos microrganismos e membranas celulares biológicas lesionadas. A CRP faz parte da família das pentraxinas e é a principal proteína plasmática de fase aguda, que apresenta rápido aumento no soro durante uma resposta a infecção ou lesão tecidual (Volanakis, Kaplan, 1971). Suas principais funções biológicas constituem o reconhecimento de patógenos e células danificadas do hospedeiro e posterior eliminação pelo recrutamento do SC e de células fagocitárias. A ativação do SC pela CRP é restrita apenas à formação da C3-convertase pela Via Clássica, que ocorre de forma semelhante à ativação por imunocomplexos (Mold et al., 1999).

1.1.2 Via Alternativa

A Via Alternativa foi proposta depois da Via Clássica com o conceito de que o SC poderia ser ativado mesmo na ausência de anticorpos (Pillemer et al., 1954). Esta via é iniciada a partir da hidrólise espontânea da ligação de tiól-éster da cadeia α de C3, resultando na molécula $\text{C3(H}_2\text{O)}$ (**Figura 2**), a qual é conformacionalmente semelhante ao fragmento C3b, onde o Fator B (FB) pode se ligar e posteriormente ter sua porção N-terminal clivada pelo Fator D (FD) em dois fragmentos, Ba e Bb. O fragmento Bb permanece ligado a $\text{C3(H}_2\text{O)}$ formando

o complexo C3(H₂O)Bb, a primeira C3-convertase da Via Alternativa (Lanham, Hughes-Jones, 1984; Law, Dodds, 1990). O FB também pode se ligar à molécula de C3b, ser igualmente clivado pelo FD e formar a segunda C3-convertase da Via Alternativa (C3bBb) (Götze, 1986; Choy et al., 1992). Ambas C3-convertases sofrem ação do Fator P (properdina) que estabiliza estas enzimas e amplifica a clivagem de C3 (Fearon, Austen, 1975).

Assim como a Via Clássica, a Via Alternativa também forma C5-convertase (C3bBbC3b), capaz de clivar C5 em C5a e C5b, como anteriormente descrito, e dar início à formação do MAC.

Figura 2 – Ligação tiól-éster. (A) C3 nativo com ligação tiól-éster entre moléculas de carbono e enxofre íntegra sinalizada pela seta vermelha. (B) Hidrólise da ligação tiól-éster entre moléculas de carbono e enxofre (seta) iniciando a ativação da Via Alternativa. (Adaptado de Walport, 2001).

1.1.3 Via das Lectinas

A última das vias do SC a ser descrita, também ativada sem a presença de anticorpos. Inicia-se a partir da ligação de lectinas, como a *mannose binding lectin* (MBL) e ficolinas, aos resíduos de carboidratos ou resíduos acetilados presentes exclusivamente na superfície de patógenos. A MBL possui estrutura semelhante a C1q e três serino proteases encontram-se associadas à MBL: a serino protease associada à MBL (MASP)-1, MASP-2, e a MASP-3. MASP-1 e MASP-2 possuem estrutura análoga a C1r e C1s e, uma vez que MBL se liga ao carboidrato na superfície do patógeno, MASP-2, que apresenta função homóloga a C1s, sofre uma mudança conformacional e cliva o zimógeno C4 em C4a e C4b (Matsushita, Fujita, 1992; Holmskov et al., 1994; Thiel et al., 1997). A MASP-3, última das MASPs a ser descoberta, também apresenta estrutura semelhante às outras proteases da família das serino-proteases *MASP-like* (C1r, C1s, MASP-1 e MASP-2) e pode ser encontrada associada a MASP-2, formando um grande oligômero. A MASP-3 pode regular a deposição do fragmento C4b ligando-se ao complexo MBL/MASP-2 ou impedindo a formação do mesmo, inibindo a clivagem do fragmento C4 pela MASP-2 (Dahl et al., 2001). Além da função inibitória, a MASP-3 possui função ativadora, onde a protease cliva pró-FD em FD, o qual é capaz de clivar FB e formar a C3-convertase da Via Alternativa, criando um *link* entre as Vias Alternativa e das

Lectinas (Dobó et al., 2016). Da mesma forma que ocorre na Via Clássica, o fragmento C4b se liga covalentemente à superfície do patógeno, permitindo a ligação da proteína C2, a qual também é clivada por MASP-2 em dois fragmentos, o C2a e C2b. O fragmento C2a ligado em C4b forma a C3-convertase (C4b2a), capaz de clivar a proteína C3 em C3a e C3b. O fragmento C3b pode se ligar à C3-convertase já formada na superfície do patógeno e dar origem à C5-convertase (C4b2a3b), que possui a capacidade de clivar moléculas de C5 em dois fragmentos, o fragmento C5a e o C5b, o último com a capacidade de dar início à formação do MAC (Holmskov et al., 1994).

1.1.4 Formação do Complexo de Ataque à Membrana

Ao sofrer a ação da C5-convertase, C5 é clivado gerando os fragmentos C5a e C5b. O fragmento C5b interage com a proteína C6 que, por sua vez, é capaz de interagir com C7 mesmo na fase aquosa. A proteína C8 interage com o complexo, formando C5b-8, o qual fica estabilizado na bicamada lipídica, facilitando a polimerização de moléculas de C9, formando o complexo C5b6789_(n) (**Figura 3**) que é capaz de formar poros na membrana celular e causar lise osmótica em diversos patógenos (Podack et al., 1976; Tschopp, Podack, 1981).

Figura 3 – Representação do Complexo de Ataque à Membrana. Fragmento C5b ligado às proteínas C6, C7, C8 e diversas moléculas de C9, que darão origem ao MAC, formando um poro na superfície celular (Modificado de Bubeck, 2014).

1.1.5 Funções do Sistema Complemento

A fagocitose é importante na eliminação de células apoptóticas e de patógenos, para a homeostasia e resolução de processos inflamatórios, estabilizando o organismo. A opsonização

de patógenos ocorre pela deposição de anticorpos, que irão auxiliar no reconhecimento, e por fragmentos do SC como C3b, C4b e iC3b, os quais irão se depositar na superfície dos patógenos ou de células em processo de apoptose e serão reconhecidos por receptores como os receptores do complemento 1, 3 e 4 (CR1, CR3 e CR4) presentes em macrófagos, monócitos e neutrófilos, facilitando a remoção de tais células, assim como de microrganismos (Merle et al., 2015). Células apoptóticas precisam ser eliminadas do organismo de forma silenciosa para garantir a homeostasia. Esse processo de remoção é realizado por fagócitos que degradam e eliminam a célula apoptótica previamente opsonizada por fragmentos do SC sem que seja montada uma resposta imunológica (Ricklin et al., 2010). Além disso, a ligação covalente de C3b pelas três vias do SC na superfície do patógeno irá culminar na ativação da via terminal do SC, na qual será formado um poro de, aproximadamente, 10 nm na superfície alvo. Esse poro promove a entrada de água, saída de componentes intracelulares, como íons, levando a um desequilíbrio osmótico e posterior morte celular (Esser, 1991).

A molécula de C1q pode se ligar a corpúsculos apoptóticos, evitando que antígenos próprios sejam reconhecidos pelo sistema imune, evitando a formação de auto-anticorpos. A deficiência de C1q está relacionada com o desenvolvimento de doenças autoimunes (Roumenina et al., 2011; Macedo, Isaac, 2016). O fragmento iC3b também possui papel importante na remoção das células apoptóticas com propriedade anti-inflamatória via interação com seu receptor CR3 em monócitos, macrófagos, células dendríticas (DC) e células da microglia (Merle et al., 2015).

O acúmulo de imunocomplexos na circulação pode causar deposição nos vasos capilares e inflamação no local. Para que isso não ocorra, o SC atua de duas formas: 1) ligando-se no complexo antígeno-anticorpo evitando que esses complexos se tornem maiores; 2) os fragmentos de C3b podem se ligar sobre a molécula de Ig e bloquear a interação com o antígeno, diminuindo o tamanho do complexo formado. Além disso, os fragmentos C3b e C4b podem se ligar ao CR1 presente nos eritrócitos e essas células conduzirão os complexos até órgãos como fígado e baço, onde os fragmentos do SC potencializarão a fagocitose por macrófagos teciduais residentes (Schifferli et al., 1986; Fearon et al., 1989; Schifferli, Taylor, 1989).

As anafilotoxinas C3a e C5a contribuem para a inflamação e ativação de células como macrófagos, eosinófilos e neutrófilos que expressam C3aR e C5aR1, induzindo a explosão respiratória. Além disso, induzem liberação de histamina por mastócitos e basófilos promovendo a vasodilatação. O fragmento C5a também é o mais potente quimioatraente do SC, sendo capaz de recrutar leucócitos para o sítio inflamatório e induzir a liberação de citocinas, auxiliando na resolução da infecção (da Silva et al., 1967; Till, 1986). O fragmento C4a é capaz

de induzir contração do músculo liso e também pode causar eritema e edema quando injetado na pele humana, porém são necessárias elevadas concentrações de C4a para que ocorram tais alterações. Mesmo assim, C4a parece não ter função quimiotática e sugere-se que sua atividade biológica seja devida à presença de outras duas anafilotoxinas na mesma preparação (Gorski et al., 1979). Além disso, ainda não se sabe se o fragmento possui um receptor exclusivo para C4a (Barnum, 2015).

Células T e células apresentadoras de antígenos (APC) expressam receptores de anafilotoxinas em sua superfície. A ligação entre as anafilotoxinas C3a e C5a com seus ligantes C3aR e C5aR1, respectivamente, provoca um aumento da proliferação de células T e da resposta com perfil inflamatório Th1, além do aumento da produção de citocinas e de moléculas coestimuladoras pelas APCs (Noris, Remuzzi, 2013). Além de regular a proliferação de células T, acredita-se que o SC regule fisiologicamente a sobrevivência dessas células e também module a resposta imune adaptativa no caso de infecções, autoimunidade e transplantes. Um estudo mostrou que camundongos deficientes de C3 possuem uma resposta Th1 reduzida em infecção por influenza, um decaimento da expressão de IL-12 e um aumento da resposta Th2 (Pekkarinen et al., 2011). O fragmento C3d ligado covalentemente ao antígeno é capaz de interagir com o CR2 presente nos linfócitos B e células foliculares dendríticas, aumentando a síntese de anticorpos específicos, além de ser importante na resposta de anticorpos dependente de células T (Dierich et al., 1987).

1.1.6 Regulação do Sistema Complemento

A ativação do SC pode ocorrer também sobre células saudáveis do hospedeiro. O produto da hidrólise de C3 na Via Alternativa, por exemplo, não diferencia entre células normais do hospedeiro e microrganismos, podendo causar danos teciduais, caso não seja regulada. A regulação do SC no hospedeiro é realizada por proteínas plasmáticas e proteínas ligadas à membrana celular que controlam a ativação e inibição do SC (**Figura 4**).

A inibição de C1r e C1s na Via Clássica e de MASP-1 e MASP-2 na Via das Lectinas ocorre pela ação do inibidor de C1 (C1INH) (Pangbun, 1986). Na Via Alternativa, Fator I (FI), juntamente com a ação de cofatores, como o Fator H (FH), cliva C3b formando seus produtos de clivagem: iC3b, C3dg e C3d. O FH compete com o fragmento Bb pela ligação a C3b, deixando-o susceptível à ação do FI (Ziccardi, Cooper, 1979). O FI também cliva o fragmento C4b na presença de C4b *binding protein* (C4BP), interrompendo sua função na Via Clássica e na Via das Lectinas (Gigli et al., 1979).

O fator de aceleração de decaimento (DAF/CD55), presente na membrana de leucócitos, neutrófilos e células epiteliais do hospedeiro, dissocia os complexos C3bBb e C4b2a, acelerando o decaimento das C3-convertases de todas as vias de ativação do SC e, conseqüentemente, impedindo a clivagem de C5 (Medof et al., 1984). Outros reguladores ligados à membrana são as moléculas CR1 (CD35), presentes em algumas células sanguíneas (Fearon, 1979), e a proteína de membrana com atividade de cofator (MCP/CD46), presente em células nucleadas (Seya et al., 1986). CR1 E MCP funcionam como cofatores para o FI clivar os fragmentos C3b e C4b, inativando-as.

O CD59 é uma glicoproteína presente na membrana de células sanguíneas, epiteliais e endoteliais que inibe a formação do MAC, ligando-se ao complexo C5b-8, impedindo que ocorra a ligação e polimerização de moléculas de C9 na membrana da célula saudável do hospedeiro (Meri et al., 1990). A regulação do MAC também pode ser feita pela clusterina, outra glicoproteína plasmática que se liga aos complexos C5b-7, impedindo que o mesmo se ancore na membrana; C5b-8, impedindo a ligação de C9 e em C5-9, impedindo a polimerização e formação do poro na membrana (Tegla et al., 2011). A clusterina está frequentemente colocalizada com uma outra glicoproteína, a vitronectina (ou S-proteína) (Tandon et al., 1992), que possui a capacidade de inativar o MAC ao se ligar a C5b-7, C5b-8 e C5b-9, formando os complexos solúveis SC5b-7, SC5b-8 e SC5b-9, respectivamente (Tegla et al., 2011).

O SC possui apenas um regulador positivo conhecido, a properdina, que possui a função de estabilizar a C3- e C5-convertase, aumentando a afinidade de C3b pelo FB, diminuindo a clivagem do fragmento C3b pelo FI, estabilizando a ativação da Via Alternativa (Fearon, Austen, 1975).

Figura 4 – Reguladores do SC. C1-INH: inibidor de C1. C4BP: proteína ligante de C4b. FI: Fator I. MBL: lectina ligante de manose. DAF: fator de aceleração de decaimento. CR1: receptor de complemento 1. MCP: proteína de membrana com atividade de co-fator. CD59: inibidor de lise de membrana. Clusterina e S-Proteína. FH: Fator H. Masp-1,2 e 3 (*Mannose binding lectin-associated serine protease*). (Modificada de Francis et al., 2003).

1.1.7 Proteína C3

A proteína C3 possui massa de aproximadamente 190 kDa e está presente em concentrações relativamente elevadas no soro humano (cerca de 1,2 mg/ml) (Sahu, Lambris, 2001). É sintetizada nos hepatócitos, principalmente (Bruijn, Fey, 1985), mas também pode provir de outras células, como monócitos/macrófagos, neutrófilos, basófilos, células endoteliais e epiteliais, mioblastos e adipócitos (Botto, 2000).

Estruturalmente, a proteína C3 contém 1.663 aminoácidos e é formada por uma cadeia α , com peso molecular de 75 kDa, e uma cadeia β , de 115 kDa, ligadas covalentemente por uma ponte dissulfeto (Botto, 2000) (**Figura 5**). O gene C3 está localizado no cromossomo 19 e possui 41 éxons, podendo conter cada um 52 a 213 pb, dos quais 25 éxons codificam para cadeia α e 16 codificam para cadeia β (Sahu, Lambris, 2001).

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura geral da proteína C3 do SC e de seus fragmentos. A proteína C3 é formada por duas cadeias, uma cadeia maior α e uma menor β , as quais estão ligadas covalentemente por uma ponte dissulfeto (SS). Foi representada na figura (seta) a porção da cadeia α onde a C3-convertase age, liberando o fragmento menor C3a. O fragmento C3b, que permanece ligado à membrana do patógeno, é formado pelas cadeias α' e β . C3b ainda pode ser clivado pelo FI e formar o fragmento iC3b e C3f. iC3b ainda pode ser clivado em C3c e C3dg (Modificada de Botto, 2000).

Após ativação, as C3-convertases geradas por qualquer uma das vias clivam a proteína C3 na ligação Arg-/Ser da sua cadeia α , formando os fragmentos C3a e C3b. O fragmento C3a é um polipeptídeo de 77 aa, com estrutura de quatro hélices estabilizadas por três pontes de dissulfeto, possui uma sequência C-terminal conservada, a qual é importante para interação com seu receptor C3aR que pertence à família dos receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembranares. Uma vez ligado a seu receptor, C3a induz a transdução de sinais intracelulares via proteína G heterotrimérica e fosforilação de foinositídeo 3-quinase (PI3K), proteína quinase B (PKB) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), estimulando a síntese de quimiocinas (Merle et al., 2015). C3a é uma potente anafilotoxina que regula a vasodilatação, aumenta a permeabilidade de pequenos vasos sanguíneos e induz contração do

músculo liso (da Silva et al., 1967). Nos macrófagos, neutrófilos e eosinófilos C3a tem a função de desencadear a explosão respiratória, age na liberação de grânulos de histamina de mastócitos e basófilos, na liberação de serotonina das plaquetas, e em células B e monócitos modula a síntese de IL-6 e TNF- α (Dinasarapu et al., 2012). A regulação da atividade de C3a é feita pela carboxipeptidase N, uma metaloprotease que cliva o resíduo de arginina na porção carboxi-terminal, dando origem ao fragmento C3a-desArg, o qual não é mais capaz de se ligar ao receptor C3aR, sendo desprovido de função conhecida até o momento (Matthews et al., 2004).

O FI tem função proteolítica e é capaz de clivar a cadeia α' do fragmento C3b, na presença de cofatores como o FH, MCP e CR1, formando iC3b, que permanece ligado à membrana celular, e C3f. O fragmento iC3b, assim como C3b, tem como função opsonizar a membrana do patógeno e, ainda, pode sofrer novamente a ação do FI, também com a presença de cofatores, e é clivada em C3c e C3dg. A última molécula também pode sofrer ação de proteases e ser clivada em dois últimos fragmentos: C3d e C3g (Noris, Remuzzi, 2013).

1.2 Leptospiras

As bactérias do gênero *Leptospira* foram descobertas no início do século XIX (Inada et al., 1916), são membros da família *Leptospiraceae* e pertencem à ordem *Spirochaetales*. São microrganismos aeróbios, crescem lentamente entre 28 °C - 30 °C de temperatura (Faine et al., 1999), são morfológicamente finos (medindo cerca de 6-20 μm x 0,1 μm), helicoidais, com flagelos no seu espaço periplasmático, que conferem motilidade às bactérias, e extremidades em forma de gancho (**Figura 6**) (Adler, Moctezuma, 2010). São constituídas por uma camada porosa que cerca sua membrana citoplasmática e parede celular. Esses poros são necessários para a troca de solutos entre o ambiente onde estão presentes e o espaço periplasmático (Plank, Dean, 2000). Devido à sua morfologia fina, sua visualização pelo microscópio óptico comum é difícil, sendo necessária uma microscopia óptica sob campo escuro para que possa ser observada (World Health Organization, 2003).

Figura 6 – Morfologia da bactéria *Leptospira*. A) Bactérias medindo aproximadamente 0,1µm de largura e 6 µm de comprimento com formato fino e espiralado. Esse formato, juntamente com seus flagelos nas extremidades em forma de gancho, confere à bactéria seus movimentos de rotação e translação. B) Ampliação da superfície bacteriana, sendo possível observar seu formato em espiral (Bharti et al., 2003).

Esses microrganismos necessitam de seus hospedeiros naturais vertebrados para sua manutenção e reprodução, mas ao serem liberados pela urina dos mesmos, podem permanecer viáveis por longos períodos, quando em contato com a água ou solo úmido (Plank, Dean, 2000).

O gênero é composto por 22 espécies separadas em não patogênicas (saprófitas), intermediárias e patogênicas (**Tabela 1**) (Picardeau, 2013). As bactérias podem ser classificadas sorologicamente pela composição de lipopolissacarídeos (LPS) expressos na sua superfície, tendo sido identificados mais de vinte sorogrupos e duzentos sorovares, ou com base no seu genoma. Até hoje, foram identificadas dezesseis espécies de *Leptospira* patogênicas e mais seis espécies de *Leptospira* saprófitas, com base em suas características genômicas, sendo que entre as espécies patogênicas, sete delas são as principais causadoras da leptospirose (Ko et al., 2009; Evangelista, Coburn, 2010). A espécie *L. interrogans* é comumente utilizada para se referir às espécies patogênicas e a *L. biflexa* para espécies saprófitas (Ahmed et al., 2006). Seu genoma possui entre 3,9 a 4,6 megabases (Mb) e, dentro das espécies já conhecidas, apenas seis genomas de três espécies foram sequenciados até o momento (Adler, Moctezuma, 2010).

Tabela 1 – Principais espécies patogênicas, intermediárias e saprófitas de bactérias do gênero *Leptospira*.

Espécie	Referência
Patogênicas	
<i>L. alexanderi</i>	Brenner et al., 1999
<i>L. alstonii</i>	Smythe et al., 2013
<i>L. borgpetersenii</i>	et al., 1987
<i>L. interrogans</i>	Faine e Stallman, 1982
<i>L. kirschneri</i>	Ramadass et al., 1992
<i>L. kmetyi</i>	Slack et al., 2009
<i>L. mayottensis</i>	Bourhy et al., 2014
<i>L. noguchi</i>	Faine e Stallman, 1982
<i>L. santarosai</i>	Yasuda et al., 1987
<i>L. weilii</i>	Yasuda et al., 1987
Intermediárias	
<i>L. broomi</i>	Levett et al., 2006
<i>L. fainei</i>	Perolat et al., 1998
<i>L. inadai</i>	Yasuda et al., 1987
<i>L. licerasiae</i>	Matthias et al., 2008
<i>L. wolffii</i>	Slack et al., 2008
Não patogênicas	
<i>L. biflexa</i>	Faine e Stallman, 1982
<i>L. idonii</i>	Saito et al., 2013
<i>L. meyeri</i>	Yasuda et al., 1987
<i>L. terpstrae</i>	Smythe et al., 2013
<i>L. vanthielii</i>	Smythe et al., 2013
<i>L. wolbachii</i>	Yasuda et al., 1987
<i>L. yanagawe</i>	Smythe et al., 2013

Não é possível diferenciar as espécies de *Leptospira* apenas morfologicamente. Para diferenciação dos sorovares é aplicada a técnica de soroaglutinação microscópica (MAT), empregando anticorpos específicos, onde os sorovares aglutinam de acordo com as suas características antigênicas (WHO, 2003).

No corpo humano, a bactéria penetra por mucosas e pela pele íntegra ou lesionada, podendo ser encontrada em qualquer órgão ou tecido. A infecção pode ser controlada pelo sistema imunológico, mas, mesmo assim, algumas estirpes podem permanecer depositadas nos túbulos renais e serem continuamente liberadas na urina (WHO, 2003).

1.3 Leptospirose

Essa doença foi descrita pela primeira vez por Adolf Weil que a caracterizou como uma síndrome infecciosa aguda, apresentando alterações como esplenomegalia, icterícia e nefrite (Weil, 1886). A leptospirose é uma doença emergente causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, descobertas como o agente causador em 1916 por Inada et al. É uma doença de distribuição global e a infecção ocorre, em sua maioria, em locais com clima tropical, com condições sanitárias insatisfatórias, enchentes e/ou desastres naturais (Guerra, 2003).

A infecção humana por *Leptospira* pode ocorrer diretamente por meio do contato com tecido, urina ou fluídos de animais infectados, principalmente roedores, mas também por meio de outros animais como gado, cachorros, gatos, e alguns animais selvagens como gambás e morcegos, ou indiretamente, através do contato com água e solo contaminados por *Leptospira* excretada pela urina dos animais infectados (Vijayachari et al., 2008) (**Figura 7**). Esses animais servem como reservatórios para estas espiroquetas, as quais podem permanecer nos túbulos distais dos rins e podem ser eliminadas pela urina desses animais durante anos, muitas vezes assintomaticamente (Rao, 2006; Sehgal, 2006).

Essa infecção foi primeiramente associada a atividades ocupacionais entre fazendeiros, trabalhadores de minas, esgotos, matadouros, pescadores, produtores de leite, militares e veterinários, mas, após medidas protetoras entre esses grupos, percebeu-se que a doença não tinha apenas vínculo ocupacional, sendo associada também às condições precárias de moradia e falta de saneamento básico, além de práticas de esportes aquáticos ou atividades recreativas em águas contaminadas (Bharti et al., 2003).

A doença pode se apresentar de forma bifásica, sendo a primeira fase caracterizada com sintomas pouco específicos. Caso a doença progrida, o indivíduo pode desenvolver o estágio mais grave da leptospirose, denominada Síndrome de Weil (CDC, 2011). As manifestações clínicas da primeira fase da doença são principalmente: febre, dor de cabeça, mialgia, dispneia, náuseas e vômitos, podendo ser confundida com outras patologias como dengue, hepatite, febre amarela, malária, entre outras, dificultando o diagnóstico precoce da doença (Hartskeerl et al., 2011). Nos casos da Síndrome de Weil, o indivíduo apresenta sintomas como icterícia, problemas renais e hepáticos, e hemorragia (Ko et al., 2009; Evangelista, Coburn, 2010; Chirathaworn, Kongpan, 2014). A síndrome de Weil é causada em humanos normalmente pela *Leptospira interrogans* sorogrupo *Icterohemorrhagiae* no Brasil (Brito et al., 1992), sendo o sorovar *Copenhageni* o mais comum no Brasil (Ko et al., 1999; Romero, Yasuda, 2006; Faria et al., 2008; Miraglia et al., 2013), tendo o rato como principal reservatório natural (WHO,

2003). Os sorovares podem ser associados aos seus animais reservatórios, às condições ambientais e ocupacionais, como por exemplo, às práticas agrícolas, sendo possível identificar a provável origem de determinada bactéria (Bharti et al., 2003).

Figura 7 – Ciclo de transmissão da leptospirose. A bactéria permanece sendo eliminada por longos períodos pela urina de seus animais carreadores que podem contaminar o ambiente. Outros animais selvagens ou domésticos podem se infectar na água ou solo contaminados e apresentar a doença ou servir de reservatório para a bactéria, eliminando-a pela urina e contaminando o solo e a água. Os humanos são os hospedeiros acidentais e a contaminação ocorre pelo contato direto ou indireto com a urina desses animais reservatórios. Após a entrada da bactéria pela pele lesada ou mucosas, a bactéria atinge a corrente sanguínea e posteriormente pode atingir órgãos como fígado, pulmão e rins causando a infecção crônica denominada Síndrome de Weil (Fraga et al., 2014a).

O diagnóstico da leptospirose é dificultado pela falta de sintomas específicos, sendo confundida muitas vezes com diversas outras doenças menos graves. Entre os testes para diagnosticar a doença estão: i) pesquisa da bactéria no sangue por microscopia óptica sob campo escuro, porém é um exame pouco sensível e com grandes chances de resultados falsos positivos; ii) a reação em cadeia usando DNA polimerase (PCR), utilizada para encontrar DNA leptospiral em amostras sanguíneas ou de urina, principalmente no período inicial da doença; iii) teste de *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) por ser mais específico, pois detecta anticorpos

IgM anti-leptospira tanto no começo da infecção, quanto IgG em fases tardias. Além da sensibilidade, tem menor custo que outros testes, como PCR, e necessita de volumes pequenos de amostra; e, iv) o teste de aglutinação microscópica (MAT), que é o método laboratorial mais utilizado. O teste consiste em um painel com diversos sorovares da bactéria para que seja detectado no soro de interesse a presença de anticorpos contra *Leptospira*. Apesar de ser um teste confiável, a eficácia do teste é melhor nas fases mais tardias da doença (Yaakob et al., 2015).

O tratamento é feito através de antibióticos como doxiciclina e azitromicina nos casos menos graves e penicilina, doxiciclina ou cefalosporina de terceira geração em casos mais graves. A vacina para leptospira já existe em países como a China, Japão, Vietnã e Cuba que utilizam bactérias inteiras mortas de sorovares locais como forma de prevenção, além de já existirem vacinas para prevenir a contaminação de cães e gado (Adler, Moctezuma, 2010). No entanto, ainda não existe uma vacina mundialmente eficaz contra leptospirose (Chikeka, Dumler, 2015),

1.4 Resposta imune contra leptospirosas

Para invadir o hospedeiro e iniciar a infecção, as leptospirosas patogênicas possuem proteínas presentes em sua superfície que permitem a interação com componentes da matriz extracelular, como elastina, colágeno e fibronectina, e células como fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (Evangelista, Coburn, 2010). As leptospirosas patogênicas possuem a capacidade de interagir com o sistema fibrinolítico pela captura de plasminogênio ou pela ativação em plasmina que, uma vez gerada, facilita a migração da bactéria através da barreira endotelial (Vieira et al., 2013; Castiblanco-Valencia et al., 2016). Ao passar da barreira endotelial, as leptospirosas caem na circulação sanguínea onde serão reconhecidas inicialmente pelo sistema imune inato. Bactérias Gram-negativas, como é o caso da leptospira, possuem lipopolissacarídeos (LPS) em sua membrana que serão reconhecidos pelas células do sistema imune. No soro está presente a *LPS-binding protein* (LPB) que tem como função se ligar ao LPS permitindo o reconhecimento via CD14, o principal receptor de LPS. A molécula CD14 interage com o *Toll-like receptor-4* (TLR-4), que irá causar a ativação de vias de sinalização, como a via de NF- κ B (Miller et al., 2005). Porém, o reconhecimento das leptospirosas ocorre de forma diferente observada na maioria das bactérias Gram-negativas. Nesse caso, a ativação de TLR-4 por meio da molécula CD14 é um processo que ocorre apenas em camundongos, os quais também são capazes de reconhecer leptospirosas via TLR-2. Já em humanos, o reconhecimento do LPS de leptospirosas acontece somente via TLR-2. Esses processos distintos

e as diferentes interações podem ser um dos motivos pelos quais os humanos são, em sua maioria, mais susceptíveis à bactéria enquanto camundongos são mais resistentes à infecção, visto que possuem um reconhecimento mais efetivo (Nahori et al., 2005).

Outros trabalhos mostraram a importância do reconhecimento efetivo de leptospiros patogênicos via TLR-2 e TLR-4 para o hospedeiro. Camundongos C3H/HeJ, os quais naturalmente não expressam TLR-4, são mais susceptíveis a infecção por leptospiros, fato igualmente observado em animais nocautes tanto para *tlr4*, quanto em duplos nocautes para *tlr4* e *tlr2*. Os animais que não possuem um reconhecimento efetivo das leptospiros apresentam uma infecção aguda com sintomas graves como disfunção hepática e renal, e hemorragia pulmonar. Além disso, também foi observada uma desregulação na produção de proteínas pró-inflamatórias, como o aumento de IFN- γ no fígado e a diminuição de IL-6 e TNF- α no fígado e rins, alterando também o controle do número de leptospiros viáveis em seus órgãos-alvo, quando comparados com os animais normais (Viriyakosol et al., 2006; Chassin et al., 2009). A expressão da citocina IL-1 β também é afetada em animais nocautes para TLR-2 e TLR-4, que apresentam concentrações menores. A expressão de IL-1 β pode ocorrer a partir da ativação da via de NF- κ B e também pela ativação do inflamassoma, que irá ativar caspase 1, clivando pró-IL-1 β em IL-1 β , a qual será secretada durante a resposta imune. As leptospiros se mostraram capazes de induzir a produção de IL-1 β via *Nod-like receptor protein 3* (NLRP3), um dos componentes do inflamassoma, após reconhecimento de LPS e lipoproteínas via TLR-2 e TLR-4 (Lacroix-Lamande et al., 2012).

Além de serem importantes para o reconhecimento do LPS das leptospiros, os TLRs também desempenham papel no reconhecimento da hemolisina, uma exotoxina produzida por essas bactérias que é importante para sua virulência por ser capaz de romper hemácias e induzir apoptose em linfócitos e macrófagos (Wang et al., 2008; Zhang et al., 2012). Após o reconhecimento da hemolisina pelas moléculas TLR-2 e TLR-4, é desencadeada a liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α por meio das vias de sinalização NF- κ B e JNK (Wang et al., 2008).

Para melhor entender a função do sistema imunológico durante a resposta contra as leptospiros, camundongos têm sido empregados no estudo para avaliar alterações em órgãos-alvo da doença e no sangue. Algumas linhagens de camundongos são conhecidas por serem resistentes à infecção por leptospiros, porém, espécies patogênicas foram capazes de causar lesões hepáticas e renais, além de ser possível observar a presença de bactérias vivas até quatro semanas após a inoculação (da Silva et al., 2009). Os principais danos observados no fígado são a desorganização do padrão celular no tecido, necrose, infiltrados celulares e aumento do

número de células de Kupffer. Nos rins a infecção causou danos nos túbulos renais, nefrite e a presença de infiltrados inflamatórios após 28 dias de infecção (Santos et al., 2010).

A resposta imunológica contra leptospiros depende, principalmente, da fagocitose e da produção de anticorpos. A ação dos fagócitos é potencializada quando a bactéria está opsonizada com moléculas de IgG ou com o fragmento iC3b, o que indica o papel importante de anticorpos e da resposta inata, respectivamente, durante a resposta imune contra leptospiros (Banfi et al., 1982; Cinco et al., 2002).

Após serem fagocitadas por células PMNs, as leptospiros são eliminadas pela produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Murgia et al., 2002). Além da fagocitose, neutrófilos são capazes de gerar *neutrophil extracellular trap* (NETs), redes compostas pelo DNA dessas células com propriedades antimicrobianas. A deleção de neutrófilos causou aumento na disseminação bacteriana no sangue 3 dias pós infecção e nos rins 14 dias pós infecção. Apesar da maior disseminação, os animais tratados desenvolveram nefrite nesse órgão da mesma forma que os controles, sugerindo que as leptospiros podem atingir os rins antes da formação da NETs e, posteriormente, são capazes de evadir desse mecanismo (Scharrig et al., 2015).

A importância da resposta humoral foi demonstrada após animais resistentes à infecção receberem tratamento com cliclofosfamida, substância que inibe a atividade dos linfócitos B, onde foi constatado o aumento da susceptibilidade desses camundongos à infecção por *Leptospiras* (Adler, Faine, 1976). A importância da produção de anticorpos para o hospedeiro também foi mostrada pela imunização passiva de camundongos com anticorpos anti-LPS de leptospiros, conferindo proteção nesses animais (Jost et al., 1986).

1.5 Sistema Complemento na resposta contra leptospirose

Em 2005, Meri et al mostraram que as espécies patogênicas *L. interrogans* e *L. borgpeterseni* incubadas com o soro humano normal (SHN) eram mais resistente à ação do SC, enquanto a espécie saprófita *L. bilfexa* era sensível, com deposição mais acentuada de C5, C6, C8 e C5b-C9 na sua superfície, quando comparados com as espécies patogênicas. Nesse estudo, foi demonstrado que as leptospiros patogênicas são capazes de se ligar ao FH, um inibidor da ação da C3-convertase, capaz de inativar os fragmentos de C3. Além disso, nosso grupo demonstrou que estirpes patogênicas de *Leptospira* são capazes de se ligar ao C4BP por intermédio da proteína LcpA, presente na superfície de espécies patogênicas (Barbosa et al., 2009; Barbosa et al., 2010). Essa aquisição dos reguladores do SC pelo patógeno causa uma diminuição da ativação do SC, que acaba depositando menos componentes da Via Terminal

(C5b-C9) e, conseqüentemente, ocorre menor formação do MAC na membrana externa do patógeno. Tal fenômeno é observado apenas em espécies patogênicas e não em espécies com patogenicidade atenuada por passagens seguidas em meio de cultura, como a *L. interrogans* sorovar Pomona, e nem em espécies saprófitas, como a *L. biflexa*. As espécies patogênicas são capazes de clivar também o fragmento C4b e sobreviver melhor, quando incubadas com SHN (Barbosa et al., 2009). Esta bactéria também se liga ao FHL-1 e FHR-1, sendo que o segundo fator parece ser mais vantajoso para a bactéria, uma vez que consegue inibir a C5-convertase e diminuir a deposição de C5b na membrana do patógeno e diminuir a ação do MAC. Esses reguladores também interagem com as proteínas *Leptospiral immunoglobulin-like A* e *B* (LigA e LigB), importantes para a virulência da leptospira, e, uma vez ligados, essas proteínas permanecem atuando na clivagem de C4b pelo C4BP e C3b pelo FH (Castiblanco-Valencia et al., 2012). A ligação do C4BP pelas proteínas Lig, ocorre principalmente pelos domínios CCP4, CCP7 e CCP 8, que se ligam na porção C-terminal da LigA e pelos fragmentos CCP7 e CCP8 na poção C-terminal da LigB e na LcpA (Breda et al., 2015).

As leptospiros patogênicas também são capazes de secretar proteases que irão clivar proteínas do SC, inativando suas vias de ativação. Essas proteases foram capazes de clivar as proteínas C3, C2, C4 e FB, os fragmentos C3b e iC3b (Fraga et al., 2014b) e as proteínas do MAC C5b, C6, C7, C8 e C9 (Amamura, 2016).

As LigA e LigB ainda são capazes de se ligar ao plasminogênio e, uma vez que essa ligação ocorra, o plasminogênio é convertido para sua forma proteolítica, a plasmina. Essa protease é capaz de degradar fibrinogênio, a proteína C5 e o fragmento C3b do SC. Essa ligação é especialmente importante para uma melhor disseminação bacteriana no hospedeiro (Castiblanco-Valencia et al., 2016).

Esses trabalhos demonstram *in vitro* a importância do SC na leptospirose, porém não há trabalhos que mostrem a importância dessa resposta *in vivo*. Nosso grupo começou a empregar modelos murinos com deficiência de C5 para observar como ocorreria a resposta. Nesse trabalho foi demonstrada a importância da proteína C5 do SC principalmente nos dias iniciais da infecção. Os camundongos B6.C5^{-/-} apresentaram uma quantidade maior de bactérias no fígado do que os camundongos selvagens, porém foram encontradas lesões mais graves nos camundongos B6.C5^{+/-}. A proliferação de células T dos camundongos selvagens apresentou mecanismo dependente de C5, sendo prejudicada na ausência da proteína. Além disso, as enzimas aminotransferase de alanina (ALT) e aminotransferase de aspartato (AST) e o ácido úrico apresentaram níveis séricos distintos entre os grupos (Castro, 2014).

A partir desses resultados, fomos investigar se C3 influenciaria de forma diferente na resposta contra a leptospira. A escolha pela proteína C3 é devido a sua importância na resposta imunológica e por participar das três vias do SC, sendo seus fragmentos importantes para a resposta inflamatória, participando da opsonização, atração de citocinas e quimiocinas e da resposta de anticorpos. Para isso, empregamos camundongos da linhagem C57BL/6 deficientes de C3 (B6.C3^{-/-}), que possuem falhas nas três vias de ativação do SC, e comparando com camundongos selvagens (B6.C3^{+/+}), e avaliamos características inflamatórias.

7 Conclusão

Concluindo, nossos resultados são capazes de mostrar que a proteína C3 do SC murino é importante para a eliminação da LPF *in vitro* nos primeiros dias de infecção e, consequentemente uma resolução mais rápida da infecção por meio de processos inflamatórios que são potencializados pela presença dos fragmentos da proteína C3, como a opsonização e posterior fagocitose, e o recrutamento de células e mediadores inflamatórios. A ausência de C3 causou uma falha nos primeiros dias da resposta inflamatória em nosso modelo animal e na eliminação da LPF, causando o aparecimento de lesões renais em uma fase mais tardia da infecção.

Referências*

- Adler B, Faine S. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* serovar Pomona. *Infect. Immun.* 1976;14:703-8.
- Adler B, Moctezuma AP. *Leptospira* and leptospirosis. 2010;140(3-4):287-96.
- Ahmed N, Devi SM, Valverde MA, Vijayachari P, Macang'u RS et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006;5:28.
- Amamura TA. Clivagem de proteínas do complexo de ataque à membrana do sistema complemento humano por proteases de leptospirosas patogênicas. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.
- Arean VM. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). 1962;40(4):393-423.
- Banfi E, Cinco M, Bellini M, Soranzo MR. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospires. *J Gen Microbiol* 1982;128:813-6.
- Barbosa AS, Abreu PAE, Vasconcellos SA, Morais ZM, Gonçalves AP et al. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human Complement regulator C4BP. *Infect Immun.* 2009;77(3):1137-43.
- Barbosa AS, Monaris D, Silva LB, Morais ZM, Vasconcellos SA. 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.
- Barnum S.R. C4a: An Anaphylatoxin in name only. *Innate Immunity.* 2015;7:333-9.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(12):757-71.
- Bourhy P, Collet L, Brisse S, Picardeau M. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. *J Syst Evol Microbiol.* 2014;64:4061-7.
- Breda LCD, Hsieh CL, Castiblanco-Valencia MM, Silva LB, Barbosa AS et al. Fine mapping of the interaction between C4b binding protein and outer membrane proteins LigA and LigB of pathogenic *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(10):1-18.
- 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. *J Syst Bacteriol.* 1999;49:839-58.
- Brito T, Prado MJ, Negreiros VA, Nicastrí AL, Sakata EE et al. Detection of leptospiral antigen (*L. interrogans* serovar copenhageni serogroup Icterohemorrhagiae) by immunoelectron microscopy in the liver and kidney of experimentally infected guinea-pig. *Int J Exp Pathol.* 1992;73(5):633-42.

*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

- Bruijn MHL, Fey GH. Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Proc Natl Acad Sci*. 1985;82:708-12.
- Bubeck D. The making of a macromolecular machine: assembly of the membrane attack complex. *Biochemistry*. 2014;53:1908–15.
- Buchner H. Über die natur der bakterientoden substanz in blutserum. *Zentrakblatt für Bakteriologie*. 1889;6:561.
- Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by Complement. *Immunity*. 2012;37:199-207.
- Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Pagotto AH, Serrano SMT, Abreu PAE et al. Plasmin cleaves fibrinogen and the human complement proteins C3b and C5 in the presence of *Leptospira interrogans* proteins: A new role of LigA and LigB in invasion and complement immune evasion. *Immunobiol*. 2016;221:679-89.
- Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB, Monaris D, Abreu PAE et al. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human Complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *J Infect Dis*. 2012;205:995–1004.
- Castro IA. Importância do componente C5 do Sistema Complemento para o controle de leptospirose in vivo em modelos murinos. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.
- Centers for Disease Control and Prevention. Leptospirosis. 2011.
- Chassin C, Picardeau M, Gounjon JM, Bourhy P, Quellard N et al. TLR-4 and TLR-2-mediated B cell response control the clearance of the bacterial pathogen *Leptospira interrogans*. *J Immunol*. 2009;183(4):2669-77.
- Choy LN, Rosen BS, Spiegelman BM. Adipsin and an endogenous pathway of Complement from adipose cells. *J Biol Chem*. 1992;267:12736-41.
- Chikeka I, Dumler JS. Neglected bacterial zoonoses. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:404-15.
- Chirathaworn C, Kongpan S. Immune responses to *Leptospira* infection: roles as biomarkers for disease severity. *Braz J Infect Dis*. 2014;18:77-81.
- Cinco M, Cini B, Perticarari S, Presani G. *Leptospira interrogans* binds to the CR3 receptor on mammalian cells. *Microb Pathog*. 2002;33:299-305.
- Cruvinel WM, Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TT, Souza AWS et al. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(4):434-61.
- Cunnion KM, Benjamin DK, Hester CG, Frank MM. Role of Complement receptors 1 and 2 (CD35 and CD21), C3, C4 and C5 in survival by mice of *Staphylococcus aureus* bacteremia. 2004;143(6):358-65.
- Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC et al. MASP-3 and its Association with distinct complexes of the mannan-binding lectin Complement activation pathway. *Immunity*. 2001;15(1):127-35.
- da Silva JB, Carvalho E, Cvarrubias AE, Ching AT, Mattaraia VG et al. Induction of TNF-alfa and CXCL-2 mRNAs in different organs of mice infected with pathogenic *Leptospira*. *Microb Pathog*. 2012;52(4):206-16.

- da Silva JB, Ramos TM, de Franco M et al. Chemokines expression during *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni infection in resistant BALB/c and susceptible C3H/HeJ mice. *Microb Pathog.* 2009;47:87–93.
- da Silva WD, Eisele JW, Lepow IH. Complement as a mediator of inflammation. 3. Purification of the activity with anaphylotoxin properties generated by interaction of the first four components of complement and its identification as a cleavage product of C'3. *J Exp Med.* 1967;126(6):1027-48.
- Dierich MP, Erdei A, Huemer H, Pitzer A, Stauder R et al. Involvement of Complement in B-cell, T-cell and monocyte/macrophage activation. *Immunol Lett.* 1987;14(3):235-42.
- Dinasarapu AR, Chandrasekhar A, Sahu A, Subramaniam S. Complement C3. *USCD Molecule Pages.* 2012;1(2):34-48.
- Divate SA, Chaturvedi R, Jadhav NN, Vaideeswar P. Leptospirosis associated with diffuse alveolar haemorrhage. *J Postgrad Med.* 2002;48:131-2.
- Dobó J, Szakács D, Oroszlán G, Kortvely E, Kiss B et al. MASP-3 is the exclusive profactor D activator in resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked. *Nature Scientific Reports.* 2016;6:31877.
- Ehrlich P, Morgenroth J. Ueber haemolysin dritte Mitteilung. *Berliner Klinische Wochenschrift.* 1900;37:453.
- Elangbam CS, Qualls Jr CW, Dahlgren RR. Cell adhesion molecules – update. *Vet Pathol.* 1997;34:61-73.
- Esser AF. Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. *Immunol Today.* 1991;12(9):316-9.
- Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 2010;5(9):1413-25.
- Faine S, Adler B, Bolin C, et al. *Leptospira and leptospirosis* (2nd ed). Melbourne: MediSci, 1999.
- Faine S, Stallman ND. Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. *J Syst Bacteriol.* 1982;32:461-3.
- Faria MT, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJA, Hartskeel RA et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop.* 2008;108(1):1-5.
- Fearon DT. Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76(11):5867-71.
- Fearon DT, Austen F. Properdin: Binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med.* 1975;142:856-63.
- Fearon DT, Klickstein LB, Wong WW, Wilson JG, Moore Jr FD et al. Immunoregulatory functions of Complement: structural and functional studies of complement receptor type I (CR1;CD35) and type 2 (CR2;CD21). *Prog Clin Biol Res.* 1989;297:211-20.
- Ferrer MF, Scarrig E, Alberdi L, Cedola M, Prete G et al. Decay-accelerating factor 1 deficiency exacerbate Leptospiral-induced murine chronic nephritis and renal fibrosis. *PLoS Neglec Trop Dis.* 2014;9(7):e102860.

- Fischer MB, Ma M, Goerg S, Zhou X, Xia J et al. Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway. *J Immunol.* 1996;157(2):549-56.
- Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Day DE, Zetoune FS et al. Functions of the Complement components C3 and C5 during sepsis. *FASEB J.* 2008;22(10):3483-90.
- Fraga TR, Carvalho E, Isaac L, Barbosa A S. *Leptospira* and leptospirosis. In: Tang YW, Sussman M, Liu D, Poxton, Schwartzman J (Eds.). *Molecular Medical Microbiology*. 2 ed. London: Elsevier, 2014a. v. 3, p.2145.
- Fraga TR, Courrol DS, Castiblanco-Valencia MM, Hirata IY, Vasconcellos SA et al. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave Complement proteins. *J Infect Dis.* 2014b;209:876–86.
- Francis K, van Beek J, Canova C, Neal JW, Gasque P. Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement. *Exp Rev Mol Med.* 2003;5:1-19.
- Gorski JP, Hugli TE, Mueller-Eberhard HJ. C4a: The third anaphylatoxin of the human Complement system. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;76(10):5299-302.
- Götze O. The Alternative pathway of activation. Em: *The complement system*. Rother K, Till GO, Berlin: Springer; 1986. 154 p.
- Gigli I, Fujita T, Nussenzweig V. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;6(12):6596-600.
- Guerra MA. Leptospirosis: public health perspectives. *Biologicals.* 2013;41(5):295-7.
- Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:494-501.
- Holmskov U, Malhotra R, Sim RB, Jensenius JC. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today.* 1994;15(2):67-74.
- Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaetosis Icterohaemorrhagica*). *J Exp Med.* 1916;23:377-402
- Jost BH, Adler B, Vihn T, Faine S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. *J. Med. Microbiol.* 1986;22:269-75.
- Kaplan MH, Volanakis JE. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J Immunol.* 1974;112:2135–47.
- Ko AI, Galvão MR, Ribeiro CMD, Johnson WD, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet Infect Dis.* 1999;354:820-5.
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Rev Microbiol.* 2009;7(10):736-47.
- Kopf M, Abel B, Gallimore A, Carroll M, Bachmann MF. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nature Med.* 2002;8(4):373-8.
- Kozono H, Kinoshita T, Kim YU, Takata-Kozono Y, Tsunawa S et al. Localization of the covalent C3b binding site on C4b within the Complement classical pathway C5 convertase, C4b2a3b. *J Biol Chem.* 1990;265:14444-9.

Lacroix-Lamande S, d'Andon MF, Michel E, Ratet G, Philpott DJ, Girardin SE, et al. Downregulation of the Na/K-ATPase pump by leptospiral glycolipoprotein activates the NLRP3 inflammasome. *J Immunol*. 2012;188(6):2805-14.

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

Leendertse M, Willems RJL, Flierman R, de Vos AF, Bontem JM et al. The Complement System Facilitates Clearance of *Enterococcus faecium* during Murine Peritonitis. *J Infect Dis*. 2010;201:544–52.

Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. *J Syst Evol Microbiol*. 2006;56:671-3.

Loos M. The Complement System: activation and control. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1985;121:7-18.

Macedo AC, Isaac L. Systemic Lupus Erythematosis and Deficiencies of Early Components of the Complement Classical Pathway. *Front Immunol*. 2016;7:55.

Marotto PCF, Nascimento CMR, Eluf-Neto J, Marotto MS, Andrade L et al. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. *Clin Infect Dis*. 1999;29:1561-3.

Martinez SA, Hostutler RA. Distal renal tubular acidosis associated with concurrent leptospirosis in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2014;50(3):203-8.

Matthews KW, Mueller-Ortiz SL, Wetsel RA. Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation. *Mol Immunol*. 2004;40:785–93.

Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL et al. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2:e213.

Matsui M, Rouleau V, Bruyere-Ostells L, Goarant C. Gene expression. Profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice. *Infect Immun*. 2011;79(11):4480-92.

Matsushita M, Fujita T. Activation of the Classical Complement Pathway by Mannose-binding Protein in Association with a Novel C1s-like Serine Protease. *J Exp Med*. 1992;176:1497-502.

Medof ME, Kinoshita T, Nussenzweig V. Inhibition of Complement activation on the surface of cells after incorporation of decay-accelerating factor (DAF) into their membranes. *J Exp Med*. 1984;160(5):1558-78.

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

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

Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System part II: role in immunity. *Front Immunol*. 2015;6:257.

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

- Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(1):36-46.
- Miraglia F, Matsuo M, Morais ZM, Dellagostin OA, Seixas FK et al. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77(3):195-9.
- Mold C, Gewurz H, Du Clos TW. Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology.* 1999;42:23-30.
- Mueller-Ortiz SL, Drouin SM, Wetsel RA. The alternative activation pathway and Complement component C3 are critical for a protective immune response against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of pneumonia. *Infect Immun.* 2004;72(5):2899-906.
- Mueller-Ortiz SL, Hollmann TJ, Haviland DL, Wetsel RA. Ablation of the complement C3a anaphylotoxin receptor causes enhanced killing of *Pseudomonas aeruginosa* in a mouse model of pneumonia. *Am J Phys Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291:157-65.
- Muensoongnoen J, Phulsuksombati D, Parichatikanond P, Sangian N, Pilakasiri C et al. A histopathological study of hearts and spleens of hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leptospira interrogans*, serovar pyrogenes. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2006;37(4):720-8.
- Murgia R, Garcia R, Cinco M. Leptospire are killed in vitro by both oxygen-dependent and -independent reactions. *Infect Immun.* 2002;70(12):7172-5.
- Nagasawa S, Stroud RM. Cleavage of C2 by C1s into the antigenically distinct fragments C2a and C2b: demonstration of binding of C2a to C4b. *Proceed Natl Acad Sci USA.* 1977;74:2998-3001.
- Nahori M, Fournié-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M et al. Differential TLR recognition of *Leptospira* lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol.* 2005;175:6022-31.
- Nakayama Y, Kim S, Kim EH, Lambris JD, Sandor M, Suresh M. C3 promotes expansion of CD8⁺ and CD4⁺ T cells in a *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol.* 2009;835(1):2921-31.
- Nangaku M. Complement regulatory proteins in glomerular diseases. *Kidney International.* 1998;54:1419-28.
- Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *Europ J Microbiol Immunol.* 2012;103-11.
- Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol.* 2013;33(6):479-82.
- Panguburn MK. Differences between the binding sites of the complement regulatory proteins DAF, CR1 and factor H on C3 convertases. *J Immunol.* 1986;136(6):2216-21.
- Pekkarinen PT, Vaali K, Junnikkala S, Rossi L.H, Tuovinen H et al. A functional complement system is required for normal T helper cell differentiation. *Immunobiol.* 2011;216:737-43.
- Pereira MM, Andrade J, Marchevsky RS, Santos RR. Morphological characterization of lung and kidney lesions in C3H/HeJ mice infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae: defect of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells are prognosticators of the disease progression. *Exp Toxicol Pathol.* 1998;50(3):191-8.
- Perolat P, Chappel RJ, Adler B, Baranton G, Bulach D.M et al. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *J Syst Bacteriol.* 1998;48:851-8.

- Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Méd Maladies Infect.* 2013;43(1):1-9.
- Pillemer L, Blum L, Lepow IH, Ross OA, Todd EW, Wardlaw AC. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science.* 1954;120:279–85.
- Pischke S, Ehmer U, Schedel I, Gratz WF, Wedemeyer H et al. Of guinea pigs and men – an unusual case of jaundice. *Z Gastroenterol.* 2010;48(1):33-7.
- Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microb Infect.* 2000;2(10):1265-76.
- Podack ER, Kolb WP, Müeller-Eberhard HJ. The C5b-9 complex subunit composition of the classical and alternative pathway-generated complex. *J Immunol.* 1976;116(5):1431-4.
- Prodeus AP, Zhou X, Maurer M, Galli SJ, Carroll MC. Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. *Nature.* 1997;390:172-5.
- Ramadass P, Jarvis BDW, Corner RJ, Penny D, Marshall RB. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *J Syst Bacteriol.* 1992;42:215-9.
- Rao M. Preventive measures for leptospirosis: Rodent control. *Ind J Med Microbiol.* 2006;24:325-8.
- Reid, KB. Activation and control of the Complement System. *Essays Biochem.* 1986;22:27-68.
- Richer L, Potula H, Melo R, Vieira A, Gomes-Solecki. Mouse model for sublethal *Leptospira interrogans* Infection. *Infect Immun.* 2015;83(12):4693-9.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunol.* 2010;11(9):785-97.
- Romero EC, Yasuda PH. Molecular characterization of *Leptospira* sp. strains isolated from human subjects in São Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(4):373-8.
- Roumenina LT, Sène D, Radanova M, Blouin J, Halbwachs-Mecarelli L et al. Functional Complement C1q abnormality leads to impaired immune complexes and apoptotic cell clearance. *J Immunol.* 2011;195(187):4369–73.
- Rupprecht TA, Angele B, Klein M, Heesemann J, Pfister H et al. Complement C1q and C3 are critical for the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the central nervous system. *J Immunol.* 2007;178:1861-9.
- Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2001;180:35-48.
- Saito M, Villanueva SY, Kawamura Y, Iida K, Tomida J et al. *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water. *J Syst Evol Microbiol.* 2013;63:2457-62.
- Santos CS, Macedo JO, Bandeira M, Chagas-Junior AD, McBride AJ et al. Different outcomes of experimental leptospiral infection in mouse strains with distinct genotypes. *J Med Microbiol.* 2010;59:1101:1106.
- Scharrig E, Carestia A, Ferrer MF, Cedola M, Pretre G, Drut R, et al. Neutrophil extracellular traps are involved in the innate immune response to infection with *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(7):e0003927.
- Schifferli JA, Ng YC, Petters DK. The role of complement and its receptors in the elimination of immune complexes. *N Engl J Med.* 1986;315(8):448-95.

- Schifferli JA, Taylor RP. Physiological and pathological aspects of circulating immune complexes. *Kidney Int.* 1989;35(4):993-1003.
- Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S et al. Clinical spectrum of pulmonary involvement in Leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of Leptospiral Burden. *Clin Infect Dis.* 2005;40:343-51.
- Sehgal S.C. Epidemiological patterns of leptospirosis. *Ind J Med Microbiol.* 2006;24:310-1.
- Seya T, Turner JR, Atkinson JP. Purification and characterization of a membrane protein (gp45-70) that is cofactor for cleavage of C3b and C4b. *J Exp Med.* 1986;163(4):837-55.
- Sjöberg AP, Trouw LA, Blom AM. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol.* 2009;30(2):83-90.
- Slack AT, Kalambaheti T, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL et al. *Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. *J Syst Evol Microbiol.* 2008;58:2305-8.
- Slack AT, Khairani-Bejo S, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL et al. *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. *J Syst Evol Microbiol.* 2009;59:705-8.
- Smythe L, Adler B, Hartskeerl RA, Galloway RL, Turenne CY, Levett PN. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. *J Syst Evol Microbiol.* 2013;63:1859-62.
- Stefos A, Georgiadou SP, Gioti C, Loukopoulos A, Ioanno M et al. Leptospirosis and pancytopenia : two case reports and review of the literature. *J Infect.* 2005;51:1131-43.
- Suresh M, Molina H, Salvato MS, Mastellos D, Lambris JD, Sandor M. Complement component 2 is required for optimal expansion of CD8 T Cells during a systemic viral infection. *J Immunol.* 2003;170:788-94.
- Takata Y, Kinoshita T, Kozono H, Takeda J, Hong K, Inoue K. Covalent association of C3b with C4b within C5 convertase of the classical complement pathway. *J Exp Med.* 1987;165:1494-507.
- Tandon N, Morgan BP, Wetman AP. Expression and function of membrane attack complex inhibitory proteins on thyroid follicular cells. *Immunol.* 1992;75(2):372-7.
- Tegla CA, Cudrici C, Patel S, Trippe R III, Rus V et al. Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunol Res.* 2011;51(1):45-60.
- Thiel S, Vorup-Jenses T, Stover CM, Schwaebler W, Laursen SB, Poulsen K et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature.* 1997;386:506-10.
- Till GO. Chemotactic factor. In *The Complement System*. Rother K, Till GO. Berlin: ed. Springer; 1986. 354p.
- Tschopp J, Podack ER. Membranolysis by the ninth component of human complement. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981;100(3):1409-14.
- Vieira ML, Alvarez-Flores MP, Kirchgatter K, Romero EC, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, et al. Interaction of *Leptospira interrogans* with human proteolytic systems enhances dissemination through endothelial cells and protease levels. *Infect Immun.* 2013;81(5):1764-74.
- Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci.* 2008;33(4):557-69.

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

Volanakis JE, Kaplan MH. Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1971;136:612-4.

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

Wang H, Wu Y, Ojcius DM, Yang F, Zhang C et al. Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through Toll-Like Receptor 2-and 4-mediated JNK and NF- κ B signaling pathways. *PLoS One*. 2008;7(8):e42266.

Weil, A. Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende, acute Infektionskrankheit. *Dtsch Arch Klin Med*. 1886;39:209-32.

Wessels MR, Butko P, Minghe M, Warren HB, Lages AL, Carroll MC. Studies of group B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:11490-4.

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

Yaakob Y, Rodrigues KF, John DV. Leptospirosis: recent incidents and available diagnostics – a review. 2015;70(6):351-5.

Yamashita DHS. Participação do componente central C3 do Sistema Complemento na atividade de macrófagos infectados por *Leptospira spp.* [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. *J Syst Bacteriol*. 1987;37:407-15.

Ziccardi RJ, Cooper RN. Active disassembly of the first complement component, C1 by C1 inactivator. *J Immunol*. 1979;123(2):788-92.

Ziccardi RJ. The first component of human complement (C1): activation and control. *Springer Semmin Immunopathol*. 1983;6:213-30.

Zhang YX, Geng Y, Yang JW, Guo XK, Zhao GP. Cytotoxic activity and probable apoptotic effect of Sph2, a sphingomyelinase hemolysin from *Leptospira interrogans* strain Lai. *BMB Rep* 2012;41: 119-25.