ÍRIS ARANTES DE CASTRO

IMPORTÂNCIA DO COMPONENTE C5 DO SISTEMA COMPLEMENTO PARA O CONTROLE DE LEPTOSPIROSE *IN VIVO* EM MODELOS MURINOS

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: Profª Drª Lourdes Isaac

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

São Paulo
2014

RESUMO

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.

Camundongos são considerados animais resistentes à infecção por leptospiras patogênicas, enquanto hamsters e cobaias têm sido os animais de escolha para se estudar a patogenicidade desta infecção. Poucos estudos têm sido feitos em modelos murinos para se entender os mecanismos imunes efetores contra este tipo de bactéria. Considerando-se que o Sistema Complemento é fundamental para a eliminação deste patógeno *in vitro*, investigamos se camundongos C5 deficientes seriam mais suscetíveis à infecção pela *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (LPF) do que camundongos C5 normais. Empregamos as linhagens isogênicas A/J $C5^-$ (A/J C5 deficiente - $C5^{-/-}$) e B6 $C5^+$ (C57Bl/6 C5 suficiente - $C5^{+/+}$) e os camundongos congênicos A/J $C5^+$ e B6 $C5^-$, ambos gerados em nosso laboratório, para este estudo de infecção *in vivo*. Camundongos C5 deficientes, independente da linhagem, possuem menor porcentagem de linfócitos T $CD8^+$ na circulação periférica do que os animais C5 suficientes, enquanto B6 $C5^-$ possui menor porcentagem de linfócitos T $CD4^+$ que B6 $C5^+$. Camundongos B6 $C5^-$ infectados por LPF possuem menores níveis de TNF, IL-6, IL-10, IL-12p40 e IL-12p70 no rim, enquanto animais A/J $C5^-$ apresentam maiores concentrações de TNF e IL-6 no rim que A/J $C5^+$. Embora a presença de C5 não tenha influenciado a capacidade dos camundongos de eliminar as leptospiras do organismo, sua presença em animais B6 agravou as lesões hepáticas causadas por estes patógenos, mostrando um efeito dependente de C5 e do fundo genético dos camundongos. O número de leucócitos presentes na circulação periférica, bem como as proporções de neutrófilos, monócitos e linfócitos B foram influenciados somente pelo fundo genético das linhagens e pelo tempo de infecção. Esse comportamento também foi observado no desenvolvimento de esplenomegalia e para a síntese de citocinas pró-inflamatórias no sangue (IFN-γ, TNF-α e IL-6). A análise histopatológica dos órgãos dos camundongos confirmou a presença de lesões pulmonares em todas as linhagens e a proliferação de linfócitos T e B nos folículos linfoides associados à bainha periarteriolar presentes no baço dos camundongos, independente de C5. Nossos resultados mostraram a influência de C5 em poucos dos parâmetros analisados, os quais poderiam diminuir a capacidade de resposta imune dos camundongos $C5^-$ durante a infecção por leptospiras. Contudo, estas diferenças não foram suficientes para afetar a capacidade dos camundongos em controlar esta infecção, sugerindo uma importância relativamente pequena de C5 neste modelo.

Palavras-chave: Sistema Complemento. C5. *Leptospira interrogans*. Resposta inflamatória. Camundongo.

ABSTRACT

CASTRO, IA. Role of complement component C5 to in vivo leptospirose control in murine models. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Mice are considered resistant to infection by pathogenic leptospires, while hamsters and guinea pigs have been considered resistant. Few studies using murine models have been used to understand the immune effector mechanisms against *Leptospira* genus. Since Complement System is important to eliminate leptospiras *in vivo* we wondered if C5 deficient mice would be more susceptible to infection by *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki type Pomona Fromm (LPF) than C5 sufficient mice. In this study we have used the isogenic strains A/J $C5^-$ (A/J C5 deficient - $C5^{-/-}$) and B6 $C5^+$ (C57Bl/6 C5 sufficient - $C5^{+/+}$) and the congenic strains A/J $C5^+$ e B6 $C5^-$, both generated at our laboratory. Independent of the strain, C5 deficient mice have lower percentage of T $CD8^+$ lymphocytes in peripheral circulation than C5 sufficient mice, while B6 $C5^-$ mice have lower percentage of T $CD4^+$ lymphocytes than B6 $C5^+$. B6 $C5^-$ mice infected by LPF present lower levels of TNF, IL-6, IL-10, IL-12p40 and IL-12p70 in the kidney, while A/J $C5^-$ mice present higher concentrations of TNF and IL-6 in the kidney than A/J $C5^+$. Although the component C5 apparently is not important to eliminate LPF in the liver and spleen of mice, the presence of this protein in B6 infected mice increased lesions in the liver of infected animals. The number of leukocytes in peripheral circulation and the percentage of neutrophils, monocytes and B lymphocytes were influenced only by genetic background of the strains. In addition, splenomegaly and concentration of pro-inflammatory cytokines in serum (IFN-γ, TNF-α and IL-6) were not influenced by C5. Histopathologycal analysis confirmed the presence of lung lesions in all mice strains and proliferation of lymphocytes in splenic B-cell corona, independently of C5. Our results showed a minor participation of C5 in the parameters analyzed, which could reduce the immune response of $C5^-$ mice. However, no significant differences between $C5^+$ and $C5^-$ mice enough to control the infection by LPF were observed suggesting that C5 is not important in this *in vivo* experimental model.

Keywords: Complement system. C5. *Leptospira interrogans*. Inflammatory response. Mouse.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leptospirose

Descrita no final do século XIX por Adolph Weil (Faine et al., 1999), a leptospirose é uma zoonose de alcance mundial (Organização Mundial da Saúde - OMS, 1999) que atinge pessoas residentes principalmente em países subdesenvolvidos situados em regiões tropicais e de clima ameno, infectando aproximadamente 500.000 pessoas todos os anos (**Tabela 1**) (Faine et al., 1999; Lau et al., 2010; Levett, 2001).

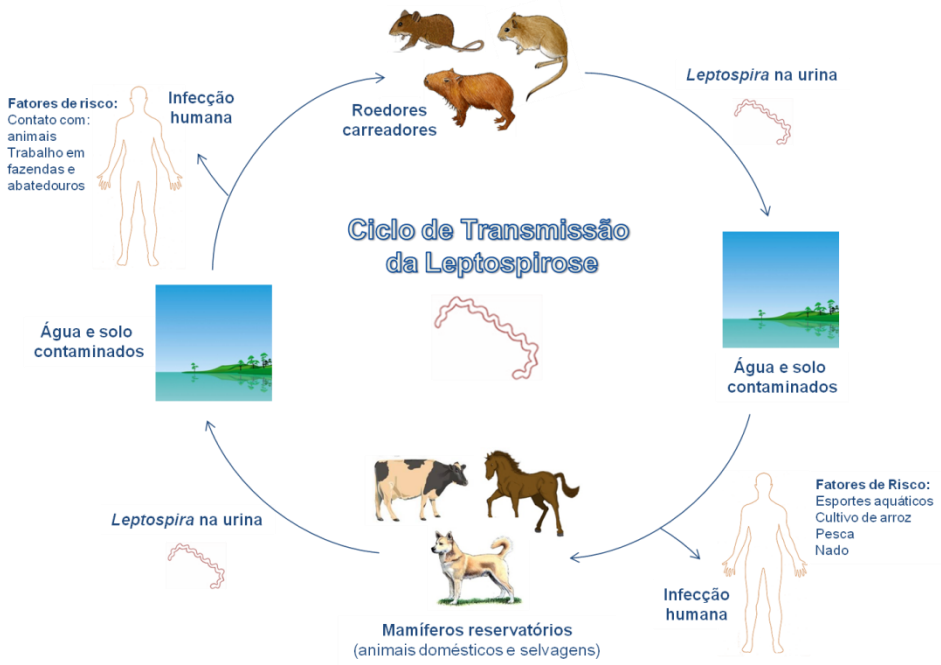
O contato com água, alimentos ou outras substâncias contaminados pela urina de organismos portadores de bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* permite que seres humanos e animais de importância econômica contraiam acidentalmente leptospirose, fato que ocorre principalmente durante os períodos de chuva intensa e em locais de clima ameno com condições sanitárias precárias (**Figura 1**) (Adler, Moctezuma, 2010; Bharti et al., 2003; Fraga et al., 2011).

Tabela 1 - Países e regiões com casos reportados de leptospirose

País ou região	**Incidência 100.000/ano**
Vanuatu	40
Antilhas, Guiana	23
Kerala, Índia	11,4
China	7,1
Nova Caledônia, França	2,1-30
Tailândia	4,1-40
Siri Lanka	11
Polinésia francesa	11
Ilhas Açores, Portugal	11
Camboja	7,7
Costa Rica	6,7
Havaí	3,3
Nova Zelândia	2,8
Cuba	2,5
Croácia	1,8
Brasil	1,7
Argentina	1,0
Austrália	0,52
Itália	0,13
Alemanha	0,06
Israel	0,05

Fonte: Adaptada de Lau et al., (2010)

Figura 1 - Ciclo de infecção da leptospirose



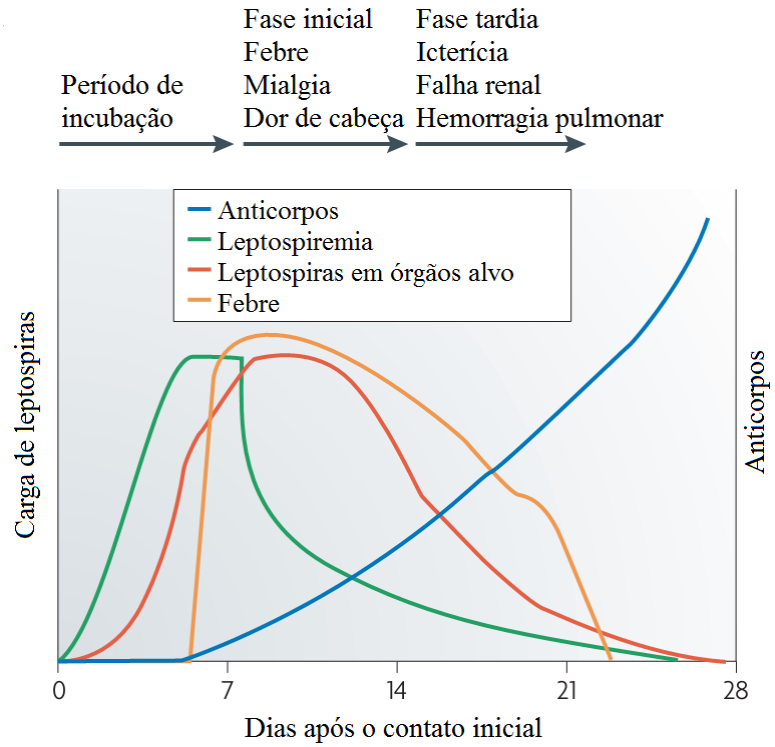
Mamíferos selvagens e domesticados podem atuar como reservatórios da *L. interrogans*, liberando constantemente a bactéria através da urina e contaminando a água e o solo. O contato de organismos saudáveis, incluindo seres humanos, com a água e solo contaminados pode iniciar um novo ciclo de infecção. (Figura cedida pela doutoranda Tatiana Rodrigues Fraga).

Causada por diferentes espécies de leptospiras, esta infecção, antes considerada predominante em profissionais como mineradores, agricultores e veterinários em contato direto com locais e animais potencialmente contaminados, também atinge cidadãos residentes em regiões com deficiência no saneamento básico e praticantes de atividades de recreação esportiva em lagoas, com maior frequência durante as estações mais chuvosas (Adler, Moctezuma et al., 2010; Bharti et al., 2003).

Inicialmente caracterizada por esplenomegalia, icterícia e nefrite (Craig, 2010 apud Weil, 1886), o que levou essa doença a ser chamada de síndrome de Weil, a leptospirose exibe um quadro clínico bastante variável dentro da população (Levett, 2001), podendo permanecer assintomática em diversos indivíduos dependendo do tipo de sorovar e do número de bactérias infectantes. Quando se manifesta, o diagnóstico de leptospirose pode ser dificultado devido ao surgimento de sintomas menos graves e frequentemente comuns a outras doenças, como febre e dores musculares, os quais podem ser sucedidos por graves lesões no fígado, rins e pulmões, sendo por isso considerada uma doença com desenvolvimento bifásico, sendo a primeira fase mais amena e a segunda mais intensa (Ko et al., 2009; Levett, 2001; Picardeau, 2013).

A primeira semana após o período de incubação da infecção, também chamada de fase aguda ou anictérica, é caracterizada pela presença desta bactéria principalmente no sangue do indivíduo e por episódios frequentes de febre. Essa fase da infecção também está associada à presença de dores retro-orbitais e fotofobia, ao desenvolvimento de hemorragia subconjuntival, a qual tende a desaparecer rapidamente, calafrios, mialgia principalmente na região lombar da coluna, coxas e panturrilhas e, em alguns casos, ao desenvolvimento de erupções cutâneas. Esses sintomas tendem a cessar coincidindo com o aumento da concentração de anticorpos específicos no organismo e não representam grandes riscos para o indivíduo, resultando em uma baixa taxa de mortalidade durante esse período (**Figura 2**, Ko et al., 2009; Levett, 2001).

Figura 2 - Modelo do desenvolvimento clínico da leptospirose com indicação de sintomas presentes nos estágios inicial e tardio da infecção



As linhas representam a produção de anticorpos (azul), quantidade de leptospiras no organismo (verde), órgãos afetados pela infecção (vermelho) e o período onde ocorrem os episódios de febre (laranja). A carga bacteriana no sangue do indivíduo permanece alta durante os primeiros dias da infecção, diminuindo concomitantemente ao aumento do número de leptospiras nos órgãos colonizados por essa bactéria. Episódios de febre são comuns no início da infecção, tornando-se menos frequentes durante a progressão da doença. São detectados anticorpos específicos contra a leptospira a partir da primeira semana de infecção, os quais podem ser encontrados em grandes concentrações em fases mais tardias da doença.
Fonte: Adaptada de Ko et al., (2009)

A fase crônica ou ictérica da doença corresponde ao momento em que a leptospira passa a ser encontrada em menor quantidade no sangue e inicia a colonização de órgãos importantes para a leptospirose, como o fígado e os rins, sendo então continuamente eliminada através da urina por períodos que variam de algumas semanas a vários meses. É durante a fase ictérica que surgem as complicações que resultam na alta taxa de mortalidade entre os pacientes diagnosticados com leptospirose, que é de aproximadamente 10% dos casos. Além do desenvolvimento de falha hepática e renal, vários pacientes apresentam icterícia, que está relacionada à perda da capacidade de metabolização da bilirrubina pelo fígado, levando ao seu acúmulo no organismo, surgimento de uveíte, miocardite, pancreatite necrótica e queda do número de plaquetas circulantes. Também tem sido relatado o aumento do número de casos de hemorragia pulmonar em diversos países, condição que reduz a probabilidade de recuperação completa do paciente (Faine et al., 1999; Levett, 2001; Lorenzo-Morales, 2012; Marotto et al., 1999; OMS, 1999; Sarkar, et al., 2002).

O diagnóstico dos pacientes com suspeita de infecção pode ser feito por diferentes técnicas, as quais buscam identificar diretamente a presença da leptospira no organismo ou de anticorpos específicos contra ela, sendo cada uma delas adequada para momentos específicos da doença. Por causa da leptospiremia durante os primeiros dias após o surgimento dos sintomas, é possível observar essas bactérias em amostras de sangue do paciente por microscopia óptica sob campo escuro. Caso a leptospiremia seja pouco intensa ou o tempo entre o surgimento dos sintomas e a realização dos exames seja longo e, por isso, poucas bactérias sejam encontradas na circulação, é recomendável a realização de reação em cadeia empregando DNA polimerase (PCR) e PCR em tempo real (RT-PCR) para quantificação e determinação da espécie infectante (Bharti et al., 2003; Lau et al., 2010; Picardeau, 2013; Vijayachari et al., 2008).

A detecção de anticorpos circulantes anti-leptospira permite a identificação do sorogrupo e é recomendada a partir do 8° dia do início dos sintomas. Após essa data já é possível encontrar títulos altos de anticorpos aglutinantes na circulação, os quais podem ser identificados tanto por teste de aglutinação de leptospiras quanto por ELISA (Bharti et al., 2003; Lau et al., 2010; Vijayachari et al., 2008).

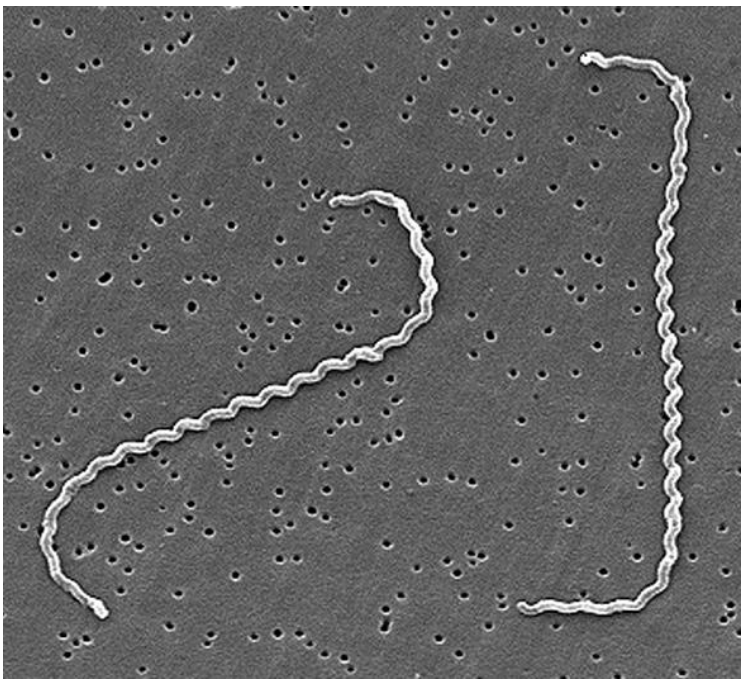
Diversos sorovares patogênicos do gênero *Leptospira*, ordem *Spirochaetales* (Faine et al., 1999) podem naturalmente ser encontrados em diferentes espécies de mamíferos. Alguns desses animais, como roedores em geral e cães domésticos, mantêm contato constante com humanos, facilitando a transmissão de leptospiras dentro da população (Guerreiro et al., 2001;

Levett, 2001). Ao contrário da espécie humana, alguns roedores são animais considerados resistentes à infecção, não desenvolvendo sinais clínicos da doença, embora tenham seus rins colonizados pelas leptospiras e sejam capazes de eliminá-las pela sua urina por longos períodos de tempo (Faine et al., 1999).

1.1.1 Leptospira

Descobertas no início do século XX (Kobayashi 2001 apud Inada e Ido, 1915), as bactérias causadoras da leptospirose fazem parte do gênero *Leptospira*, que contém espécies saprófitas como a *L. biflexa*, incapaz de se estabelecer em nosso organismo, e patogênicas como a *L. interrogans* (Adler, Moctezuma, 2010). Essas bactérias possuem formato fino, espiralado e comprimento em torno de 10 µM, além de ser comum observar uma típica curvatura em suas extremidades (**Figura 3**, Fraga et al., 2011; Ko et al., 2009; Levett, 2001).

Figura 3 - Fotomicrografia eletrônica de varredura de *L. interrogans* sorovar icterohaemorrhagie estirpe RGA



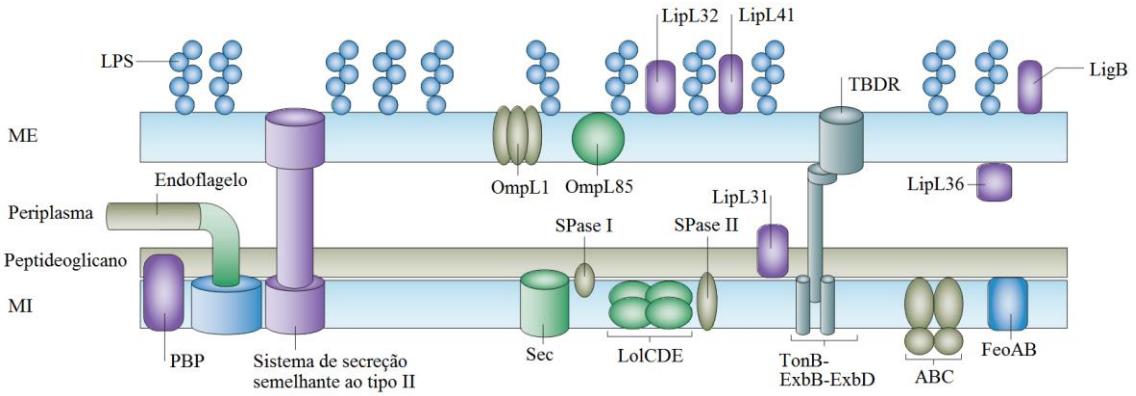
Fonte: Levett (2001)

Essas bactérias possuem uma estrutura membranar semelhante à de bactérias Gram-negativas, com a membrana celular sendo envolvida por uma parede celular, composta de peptideoglicanos, e uma membrana externa, rica em proteínas e lipopolissacarídeos (LPS), os

quais são menos tóxicos em relação a moléculas análogas de demais organismos presentes nesse grupo (**Figura 4**, Ko et al., 2009).

Apesar da menor toxicidade, as moléculas de LPS são bastante importantes, pois as variações encontradas nestas moléculas de diferentes leptospiras fornece um importante instrumento para sua classificação, permitindo agrupá-las em mais de 200 sorovares (Adler, Moctezuma, 2010; Fraga et al., 2011).

Figura 4 - Modelo da membrana celular de leptospiras indicando as principais estruturas descritas



Há uma membrana interna (MI) onde estruturas como flagelos ficam ancorados, uma fina parede de peptideoglicano que está associado à essa membrana interna, o espaço periplasmático, onde estão localizados os flagelos das leptospiras, e a membrana externa (ME), que contém moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) e diferentes proteínas em sua superfície. PBP: proteína ligadora de penicilina; Sec: sistema de secreção; LolCDE: transportador formado por LolC, LolD e LolE; ABC: transportador ABC;SPase: peptidase sinal da lipoproteína; LipL31: lipoproteína LipL31; TBDRs: Receptores dependentes de TonB; TonB–ExbB–ExbD: complexo transdutor de energia de TonB–ExbB–ExbD; FeoAB: transportador de ferro tipo FeoA–FeoB; OmpL1: porina transmembrana presente na membrana externa L1; LipL32: lipoproteína LipL32; LipL36: lipoproteína LipL36; LipL41: lipoproteína LipL41; LigB: proteína B de leptospira com domínios encontrados na superfamília de imunoglobulinas.
Fonte: Adaptada de Ko et al., (2009)

1.1.2 Modelos animais

Buscando o melhor entendimento dos fatores que podem conferir resistência contra as leptospiras, diversos autores têm empregado diferentes linhagens de camundongos em seus estudos avaliando alterações protéicas e estruturais nos órgãos mais atingidos pela doença e no sangue, bem como o efeito de cada componente do sistema imune no controle da infecção.

Tanto trabalhos mais antigos quanto os mais recentes mostram que a imunidade humoral tem um papel relevante no controle e proteção contra a leptospirose. Camundongos normalmente resistentes à *Leptospira* podem se tornar susceptíveis se tratados com ciclofosfamida, uma substância imunossupressora que inibe a atividade de linfócitos B e

impede a produção de anticorpos, afetando consequentemente a imunidade humoral (Adler, Faine, 1976; 1977). No entanto, caso esses camundongos já possuam anticorpos contra as leptospiras, ou recebam um transplante de células do baço no período entre a aplicação da ciclofosfamida e a inoculação das leptospiras, não desenvolvem leptospirose. Esses camundongos previamente imunizados contra leptospiras ou que receberam transplantes de baço apresentam anticorpos em seu soro, uma informação importante sobre a relevância do sistema imune humoral, especialmente dos linfócitos B, na cura dessa infecção. Esses resultados foram corroborados por estudos recentes, onde depletaram linfócitos B ou linfócitos T de camundongos (Chassin et al., 2009). Nesse caso, os animais infectados que não possuíam linfócitos B morriam, mostrando a grande importância destas células e, portanto, dos anticorpos, para a resistência contra essa doença. Embora a ausência de linfócitos T não afetasse a sobrevida dos camundongos infectados, os autores sugeriram que essas células devem desempenhar um papel importante na proteção de diferentes órgãos, especialmente dos rins, contra eventuais danos estruturais, como nefrite no túbulo intersticial, sendo encontradas em quantidades elevadas junto com a produção da isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (Chassin et al., 2009).

Mesmo linhagens de camundongos consideradas resistentes à infecção por leptospiras (C57Bl/6, por exemplo) sofrem lesões em órgãos como o fígado e o rim, embora esses danos ocorram em menor intensidade do que o observado em linhagens susceptíveis (C3H/HeJ, por exemplo) (da Silva et al., 2009). Contudo, mesmo linhagens de camundongos naturalmente susceptíveis a leptospiras podem não apresentar lesões pulmonares quando infectadas com doses consideradas letais para hamsters, sendo necessário aplicar inóculos com grandes quantidades de leptospiras para induzir danos nesse órgão (Marinho et al., 2009; Nally et al., 2005; Viriyakosol et al., 2006). Entre os danos observados no tecido hepático, há desestruturação do padrão de organização das células, pontos de necrose, infiltrados celulares e aumento do número de células de Küppfer. Nos rins ocorrem danos nos túbulos renais, causando nefrite, e acúmulo de infiltrados inflamatórios (Nally et al., 2005; Santos et al., 2010). Outra característica importante do desenvolvimento da leptospirose nos camundongos é que, apesar de níveis detectáveis de anticorpos sanguíneos anti-leptospiras circulantes serem encontrados três dias após a infecção (Adler, Faine, 1976), leptospiras vivas são observadas no fígado e nos rins mesmo até quatro semanas após inoculação (da Silva et al., 2009; Santos et al., 2010).

Com relação à resposta inflamatória, os níveis de diferentes quimiocinas pró-inflamatórias se aproximam dos níveis basais pré-infecção em até duas semanas nos camundongos resistentes à leptospirose, em contraposição com os camundongos susceptíveis, onde, por exemplo, o nível da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) permanece alto no soro, rins e pulmão até o período da morte, mantendo a resposta inflamatória em níveis acima do normal, o que poderia ser prejudicial para o hospedeiro (da Silva et al., 2009).

Sabendo da importância do receptor símile a Toll (TLR) 4 no reconhecimento de LPS de bactérias gram-negativas (Poltorak et al., 1998), diferentes pesquisadores buscaram observar sua importância em modelos murinos na infecção por leptospiras. Assim como observado em estudos com outras bactérias gram-negativas, camundongos da linhagem C3H/HeJ, que não expressam TLR-4, também são susceptíveis à *Leptospira*. Camundongos nocaute para o gene responsável pela expressão do TLR-4 também são mais susceptíveis à infecção por leptospiras patogênicas, o que está de acordo com o que seria esperado devido à importância desse receptor no reconhecimento de LPS (Chassin et al., 2009; Poltorak et al., 1998; Viriyakosol et al., 2006).

Assim como TLR-4, a molécula TLR-2 também reconhece LPS de leptospiras em camundongos, sendo que na sua ausência embora as células do sistema imune dos camundongos sejam capazes de reconhecer LPS pelo TLR-4 como citado anteriormente, há uma redução da intensidade da resposta imunológica contra estas bactérias (Chassin et al., 2009; Werts et al., 2001).

Da mesma forma que camundongos nocautes para *tlr4* são susceptíveis à leptospirose, animais duplo-nocautes para *tlr2* e *tlr4* desenvolvem o mesmo quadro clínico de leptospirose aguda observada em humanos, como falha das funções hepática e renal e hemorragia pulmonar. Nesses camundongos há menor controle da infecção por leptospirose, com maior número de bactérias viáveis em seus órgãos do que o observado em camundongos normais para essas duas proteínas. A ausência desses dois receptores também alterou o padrão de produção de alguns fatores pró-inflamatórios em alguns órgãos, como a redução da expressão de interferon (IFN)-γ no fígado, e aumento da expressão de interleucina (IL) 6, fator de necrose tumoral (TNF – do inglês *Tumor necrosis factor*)-α, CCL5 (proteína regulada na ativação, normalmente expressada e secretada por células T - RANTES) e CXCL2 (proteína inflamatória de macrófagos 2 - MIP-2) no fígado e nos rins (Chassin et al., 2009).

1.2 Sistema Complemento

O Sistema Complemento participa efetivamente da imunidade inata e adquirida, sendo composto por mais de 30 proteínas que podem ser encontradas no plasma e na superfície das células do organismo (Walport, 2001). Proteínas como C1q, lectinas ligadoras de manose (MBL) e C3 desencadeiam a ativação de cascatas enzimáticas que geram produtos responsáveis tanto pela eliminação da partícula alvo quanto pela estimulação de diferentes tipos celulares que auxiliarão esse processo, enquanto proteínas reguladoras como a proteína inibidora de C1 esterase (C1INH), a proteína ligadora de C4b (C4BP) e o Fator I (FI) modulam a atividade do Sistema Complemento, mantendo sua ativação sob controle e impedindo seu consumo excessivo e lesão de tecidos saudáveis (Zipfel, Skerka, 2009).

Descoberto no final do século XIX como uma substância termo-sensível presente no soro que aumentava a eliminação de bactérias por anticorpos (Walport, 2001), esse sistema é importante para a manutenção da homeostase no organismo, participando da eliminação de células apoptóticas e de complexos imunes e estimulando a angiogênese e a reparação tecidual, além de interagir com outros sistemas de cascatas enzimáticas, como o sistema da coagulação. Além dessas funções, o Sistema Complemento é importante para resposta contra infecções, promovendo a opsonização de patógenos e atraindo fagócitos para o local infectado e pode ser dividido em três vias distintas: Via Clássica, Via Alternativa e Via das Lectinas (**Figura 5**).

1.2.1 Via Clássica

A Via Clássica foi a primeira a ser descrita, sendo ativada principalmente pela interação entre a proteína C1q do complexo C1 e a porção Fc de anticorpos IgG (domínio CH_2) ou IgM (domínio CH_3) ligados a antígenos. Dessa forma, a Via Clássica atua como um elo entre a imunidade adaptativa mediada por anticorpos, com a imunidade inata. Além de C1q, o complexo C1 é formado por dois dímeros de C1r e C1s, que, quando ativados, resultam na posterior clivagem de C4 e de C2. A ligação de C1q a pelo menos duas moléculas de anticorpo IgG ou uma molécula de IgM especificamente ligadas a antígenos causa a ativação da subunidade C1r, que por sua vez cliva a subunidade C1s, tornando-a ativa. C1s irá então clivar C4 em C4a e C4b, podendo o fragmento C4b ser depositado covalentemente sobre a superfície do antígeno. Uma vez fixado, C4b interage com C2, permitindo que essa proteína também seja clivada por C1s e dê origem aos fragmentos C2a, que permanece ligado

a C4b, e C2b. O complexo C4bC2a passa a ter atividade de C3 convertase, clivando moléculas de C3 em C3a e C3b, sendo por essa razão conhecido como C3 convertase.

Assim como C4b, os fragmentos C3b podem se ligar covalentemente à superfície aceptora, podendo agir como opsoninas, originar novos complexos com atividade de C3 convertase ou interagir com os complexos C4bC2a já existentes, formando o complexo C4b2a3b, que passa a ter atividade de C5 convertase, clivando C5 em C5a e C5b e iniciando a formação do complexo de ataque à membrana (MAC, do inglês *membrane attack complex*).

1.2.2 Via Alternativa

Considerada a mais antiga na escala evolutiva, a Via Alternativa é inicialmente ativada pela hidrólise espontânea da ligação tiól-ester localizada na cadeia α da proteína C3, que passa a ser chamada C3(H_2O). C3(H_2O) pode interagir com a molécula de Fator B (FB), permitindo agora a clivagem de FB pelo Fator D (FD), gerando os fragmentos Bb, que permanece ligado a C3b e origina o complexo C3(H_2O)Bb, liberando o fragmento Ba. O complexo C3(H_2O)Bb é então estabilizado ao interagir com properdina, podendo desempenhar sua atividade de C3 conversase, sendo por esse motivo chamado de primeira C3 convertase da Via Alternativa. Assim como a C3 convertase da Via Clássica, C3(H_2O)Bb clivará C3 em C3a e C3b. C3b pode interagir com FB, que agora complexado poderá ser clivado igualmente por FD em Bb e Ba. O complexo C3bBb é estabilizado pela properdina e é capaz de clivar enzimaticamente C3, sendo chamado de segunda C3 convertase da Via Alternativa. C3b também poderá interagir com os complexos C3 convertases, originando C3(H_2O)BbC3b e C3bBbC3b, ambas com atividade de C5 convertase.

1.2.3 Via das Lectinas

Última via a ser descrita, a Via das Lectinas é ativada após a interação de carboidratos presentes em proteínas e polissacarídeos da superfície de células de microorganismos com lectinas como a proteína ligadora de manose (MBL, do inglês *mannose binding lectin*) ou com ficolinas presentes no plasma. Tanto a MBL quanto as ficolinas são estruturalmente semelhantes a C1q e interagem com as serino-proteases associadas à MBL (MASP, do inglês *MBL-associated serine proteases*; MASP-1, MASP-2 e MASP-3). Uma vez que a MBL se liga à manose, a proteína MASP-2 tem sua estrutura alterada e torna-se ativa, sendo capaz de, assim como C1s, clivar as moléculas de C4 em C4a e C4b e de C2 em C2a e C2b. Como

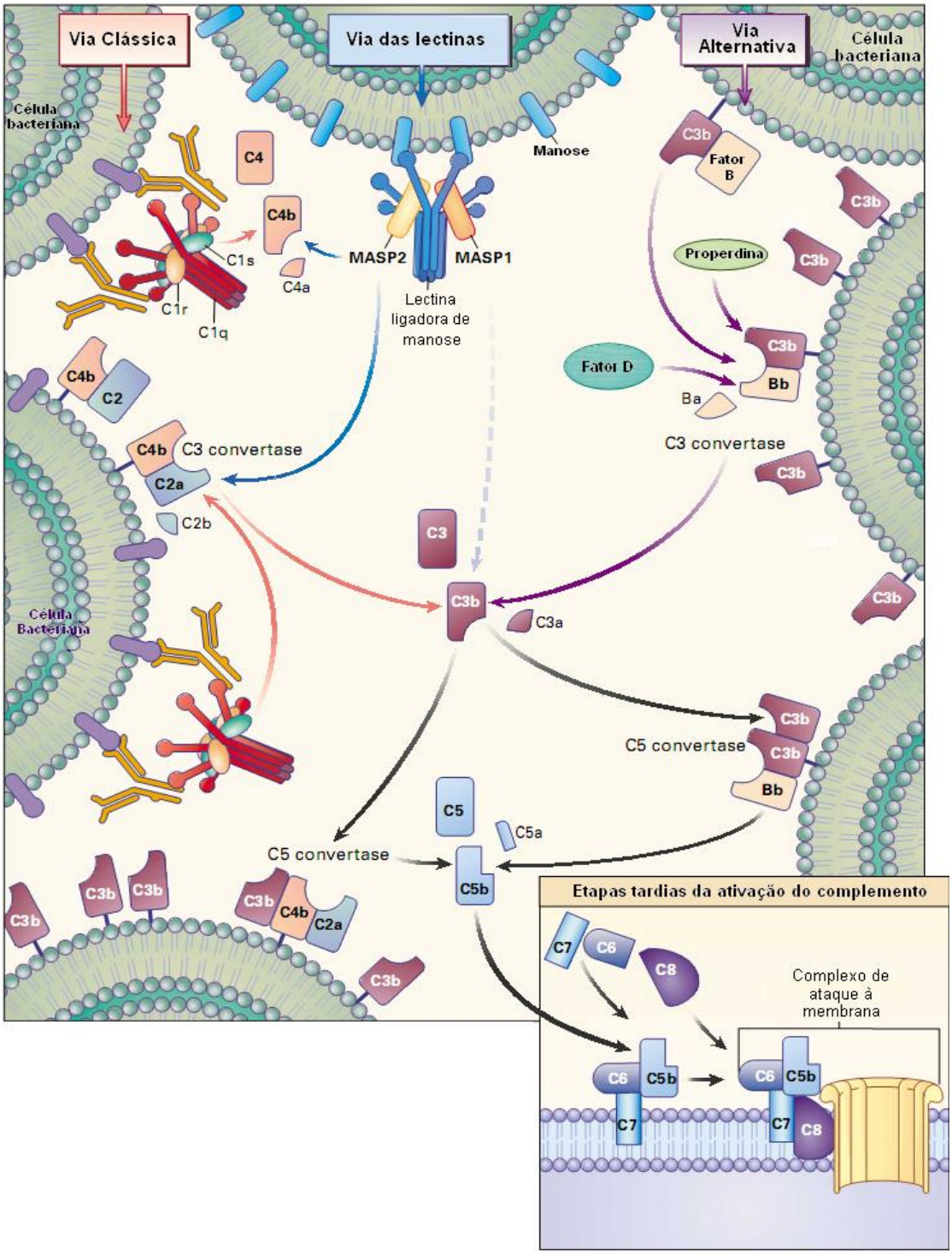
descrito para a Via Clássica, C4b pode se ligar à superfície sobre a qual houve ativação do Sistema Complemento, podendo interagir com C2. A molécula de C2 será então clivada pela MASP-2, permanecendo o fragmento C2a unido ao C4b, formando o complexo C4b2a, uma enzima com atividade de C3 convertase também gerada na Via Clássica.

1.2.4 Formação do MAC

A formação dos complexos C3bBb3b (Via Alternativa) e C4b2a3b (Via Clássica e Via das Lectinas) resulta na clivagem da proteína C5 em C5a, com importantes funções para a resposta inflamatória e C5b, que iniciará a formação do MAC.

C5b interage com C6 e na sequência C6 se liga a C7 ainda na fase aquosa, formando o complexo C5b67, capaz de interagir com membranas celulares. A interação desse complexo com C8 forma o complexo C5b678, permitindo a interação com várias moléculas de C9, formando o complexo $C5b6789_{(n)}$, também chamado de MAC. Devido à formação de um canal transmembrana, o MAC é responsável pela formação de poros na membrana da célula atacada, desregulando seu balanço osmótico e levando-a a lise.

Figura 5 - Representação das três vias de ativação do sistema do complemento e a formação do MAC

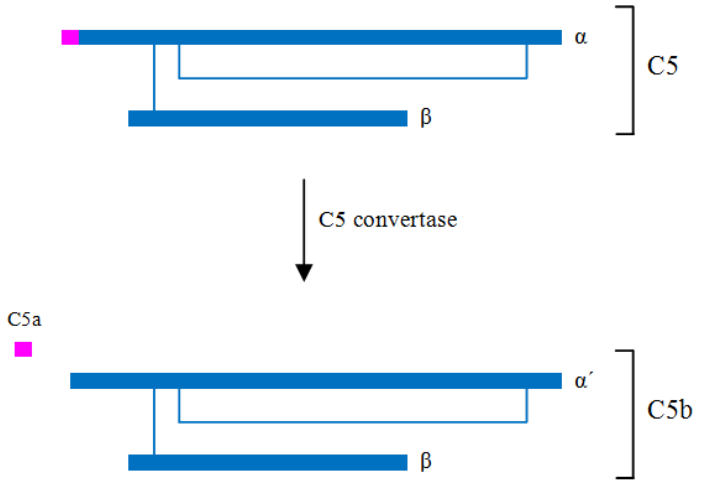


A Via Clássica (à esquerda) é geralmente ativada após a interação do complexo C1 com a região Fc de imunoglobulinas do tipo IgG e IgM ligadas especificamente a antígenos. A Via Alternativa (à direita) é ativada após a ligação covalente de C3b à superfície de antígenos. A Via das Lectinas (ao centro) é ativada após a interação de lectinas como, por exemplo, a lectina ligadora de manose a açúcares bacterianos. As três vias resultarão na formação de C5 convertase, que clivará moléculas de C5 em C5a e C5b, sendo a C5b importante para a etapa tardia do complemento (caixa inferior à figura), iniciando a formação do MAC.
Fonte: Modificado de Walport (2001)

1.2.5 Proteína C5

O componente C5 do Sistema Complemento é uma proteína solúvel, formada por duas cadeias (α e β, com massas de 115 e 75 kDa, respectivamente) unidas entre si por uma ponte dissulfeto, composta por 1676 aminoácidos e massa de aproximadamente 190 kDa (**Figura 6**). Expressada principalmente por hepatócitos, é encontrada em concentrações séricas de aproximadamente 75 µg/mL em seres humanos (Morley, Walport, 2000).

Figura 6 - Representação das cadeias α e β da proteína C5 unidas entre si por uma ponte dissulfeto



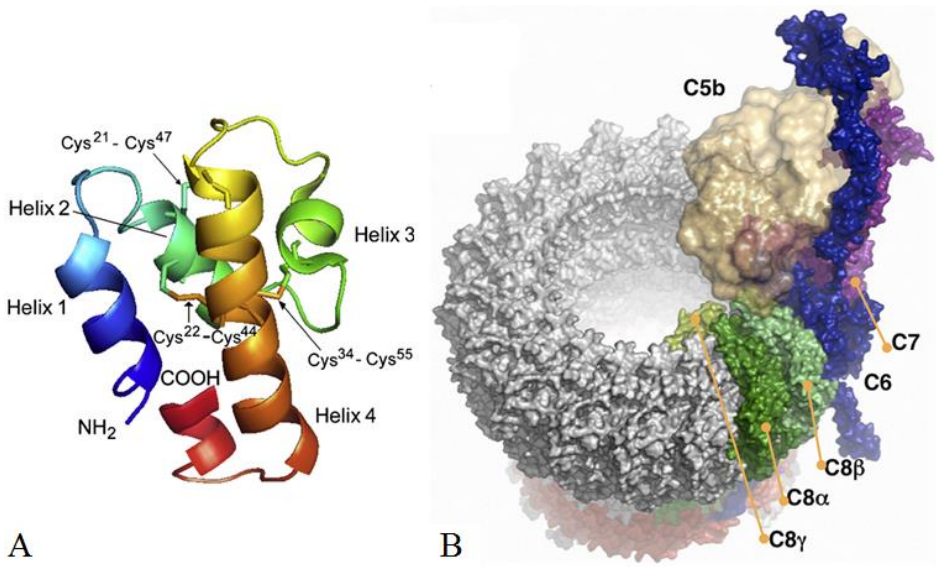
A ação da C5 convertase resulta na clivagem de C5 nos fragmentos C5a, oriundo da cadeia α e com aproximadamente 11 kDa, e C5b, que corresponde ao restante da proteína e possui aproximadamente 179 kDa. Figura cedida pela doutoranda Tatiana Rodrigues Fraga.

Localizado no cromossomo 2 murino, o gene que codifica para C5 é composto por aproximadamente 78 kb, organizado em 42 éxons e 41 íntrons. Trabalhos do final dos anos 80 mostraram a presença de duas variantes alélicas desse gene em camundongos, sendo uma delas responsável pela ausência de C5 no soro e consequente falta de atividade hemolítica no soro das linhagens A/J, AKR e DBA (D'Eustachio et al., 1986). O sequenciamento de livrarias de cDNA indicaram que essa incapacidade para sintetizar C5 era causada por uma deleção de dois pares de base (TA) no éxon 7 do gene de *c5*, resultando na formação de um códon de parada prematuro que impede a tradução do RNA mensageiro (RNAm) em uma proteína funcional (Haviland et al., 1991; Wetsel et al., 1990).

A formação de enzimas C5 convertases possibilita a clivagem de C5 em dois fragmentos C5a e C5b (Morley, Walport, 2000). C5a (**Figura 7A**), um fragmento de 11 kDa e 74 aminoácidos, corresponde à região amino-terminal da cadeia alfa de C5 e permanece

solúvel, tendo sua atividade mediada principalmente pelo receptor de C5a (C5aR – CD88) presente em diversos tipos celulares (Guo, Ward, 2005; Monk et al., 2007; Morley, Walport, 2000). Uma vez formado, este fragmento é rapidamente clivado por peptidases presentes no sangue que removem o aminoácido arginina da porção C-terminal do fragmento, dando origem ao fragmento chamado C5adesArg (Bokisch, Müller-Eberhard, 1970). Embora menos potente, C5adesArg é capaz de desempenhar funções semelhantes às de C5a (Eglite et al., 2000; el-Lati et al., 1994), sendo capaz de interagir com os mesmos receptores (Cain et al., 2001; Scola et al., 2007). Maior fragmento de C5, C5b possui 1602 aminoácidos e massa de 179 kDa, correspondendo ao restante da cadeia α (α', 104 kDa) que permanece unida à cadeia β (75 kDa). Esse fragmento é responsável por iniciar a formação do MAC (**Figura 7B**), uma estrutura capaz de formar poros na membrana da célula onde há ativação do Sistema Complemento e estimular células do organismo durante a inflamação (Dobrina et al., 2002). Outras funções biológicas de C5b serão abordadas no item 1.2.5.2.

Figura 7 - Estrutura de C5a e do MAC



O fragmento C5a (A) tem origem a partir da clivagem da cadeia α de C5 pela C5 convertase e é composto por 74 aminoácidos organizados em 4 α-hélices (Manthey et al., 2009). O maior fragmento gerado na clivagem de C5 é chamado de C5b e, após interagir com moléculas de C6, C7, C8 e diversas proteínas C9 forma o complexo $C5b6789_{(n)}$, também denominado MAC (B - Aleshin et al., 2012).

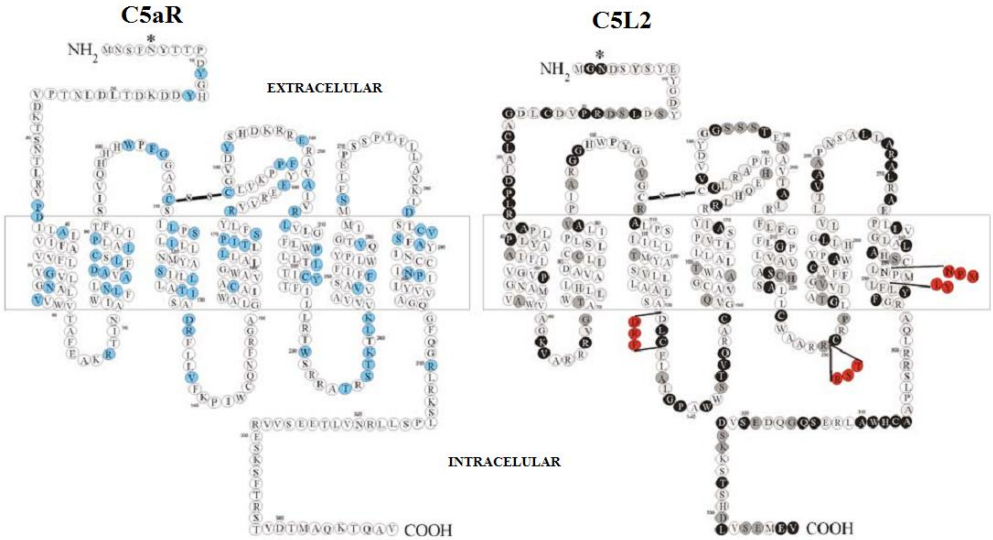
1.2.5.1 Atividade de C5a

Inicialmente descrito como uma molécula com capacidade quimiotática, o fragmento C5a desempenha diversas funções no organismo, participando da resposta imune através do

estimulo à desgranulação de mastócitos, aumento da síntese de moléculas de adesão por células endoteliais, atração de leucócitos circulantes para o sítio inflamatório, elevação da capacidade de eliminação de partículas fagocitadas por neutrófilos e macrófagos e aumento da síntese e liberação de citocinas por diferentes tipos celulares (Manthey et al., 2009). Diversos trabalhos também mostram a importância de C5a para a manutenção da homeostase do organismo, sendo importante nos processos de reparação tecidual, promoção de angiogênese e produção de fatores de crescimento (Markiewski et al., 2009; Mastellos et al., 2001).

Primeiro receptor de C5a descrito, C5aR é uma proteína de membrana que permanece acoplada a uma proteína G (**Figura 8**). O estímulo deste receptor com C5a e C5adesArg causa diversos efeitos na célula, como aumento da concentração de cálcio intracelular, ativação de diferentes cascatas de sinalização e alteração da transcrição gênica (Monk et al., 2007). Apesar da similaridade com C5aR, C5L2 (**Figura 8**), outro receptor de C5a e C5adesArg, não permanece acoplado a nenhuma proteína G, não estando ainda elucidados o seu mecanismo de ação e sua função biológica. Há trabalhos que sugerem um papel na competição e retirada de C5a e C5adesArg da circulação, minimizando os efeitos pró-inflamatórios desses fragmentos (Gao et al., 2005; Gerard et al ., 2005). No entanto, outros estudos mostram que animais deficientes de C5L2 têm uma resposta reduzida a determinados estímulos inflamatórios (Chen et al., 2007).

Figura 8 – Receptores de C5a



Os receptores C5aR e C5L2 são estruturalmente semelhantes entre si, possuindo uma região N-terminal extracelular, sete porções transmembrana e uma cauda C-terminal intracelular. Os resíduos marcados em vermelho em C5L2 correspondem à resíduos presentes em C5aR que são importantes para o acoplamento da proteína G. Adaptado de Monk et al., 2007.

Trabalhos da década de 70 já mostravam a importância de C5 para a atração de leucócitos aos sítios inflamatórios (Snyderman et al., 1971; Ward, Zvaifler, 1971). O acompanhamento de camundongos C5 deficientes inoculados intraperitonealmente com endotoxinas de *Salmonella typhosa* mostrou que o acúmulo de células polimorfonucleares (PMN) na cavidade peritoneal era bastante reduzido em relação aos animais C5 normais (Snyderman et al., 1971). A incubação de células de animais C5 deficientes com soro de camundongos C5 normais mostrou a capacidade de resposta quimiotática por esses leucócitos, indicando que a deficiência para C5 não influencia a aptidão de PMN para responder a fatores quimiotáticos presentes no soro. Contudo, a ausência de C5 no soro diminui a atividade de PMN de camundongos C5 normais e C5 deficientes, sugerindo a importância dessa proteína para a atração desses leucócitos. Assim como PMN, monócitos também são atraídos por C5a, sendo esse efeito mantido mesmo quando essas células são estimuladas com C5adesArg, embora a atividade desempenhada por este fragmento seja aproximadamente 100 vezes menor em relação à C5a (Marder et al., 1985).

Segundo diferentes estudos, esse efeito quimiotático de PMN é dependente de C5aR e se estende a diferentes tipos celulares. Camundongos C5aR deficientes apresentam menor atração de neutrófilos para sítios de injúria (Xu et al., 2009). Linfócitos T ativados aumentam a expressão deste receptor e também são atraídos por fragmentos de C5a (Nataf et al., 1999).

Granulócitos incubados com *E. coli* na presença de inibidores de C5aR apresentam menor produção de espécies reativas de oxigênio e, da mesma forma que monócitos, têm menor capacidade de fagocitose (Mollnes et al., 2002).

Camundongos C5 deficientes possuem menor atividade de linfócitos T $CD4^+$, macrófagos e células dendríticas (Liu et al., 2013; Mashruwala et al., 2011; Moulton et al., 2007). Macrófagos e células dendríticas desses animais produzem menores quantidades de IL-12p70 que as células de animais C5 normais. Essa pequena produção de IL-12(p70) junto à ausência de C5a leva a menor ativação dos linfócitos T $CD4^+$, resultando em menor produção de IFN-γ por essas células (Mashruwala et al., 2011; Moulton et al., 2007). Essa maior dificuldade em organizar uma resposta Th1 pode explicar a maior susceptibilidade de camundongos C5 deficientes a bactérias do gênero *Mycobacterium*.

C5a também é importante para o controle de infecções virais. A inibição da interação C5a-C5aR é capaz de reduzir a resposta antiviral dependente de linfócitos T $CD8^+$, ocasionando menor produção de IFN-γ e atividade lítica reduzida contra células infectadas (Kim et al., 2004).

1.2.5.2 Atividade de C5b

A ativação do Sistema Complemento resulta, independente da via de ativação, na formação do MAC. Devido à sua capacidade de interagir com a superfície de células e formar poros capazes de causar sua lise, sua função lítica foi a primeira a ser descrita e melhor conhecida.

Entretanto, bactérias gram-positivas e microorganismos encapsulados geralmente são resistentes a essa atividade do MAC. Diferentes microorganismos também utilizam diversos mecanismos para evadir a lise mediada pelo complemento, seja através da secreção de enzimas que clivam proteínas do complemento, ou pela interação com reguladores presentes no organismo que impedem a ativação desse sistema sobre sua superfície.

Essas dificuldades impostas pelos microorganismos para a atividade lítica do MAC geram questionamentos sobre a possibilidade deste complexo desempenhar outras funções além da lise celular. Assim como C5a, quando presente na fase aquosa, o MAC é capaz de induzir a quimiotaxia e migração de leucócitos através do estímulo à produção de IL-8 e MCP-1 pelas células endoteliais (Dobrina et al., 2002).

Além dessa função quimiotática, a participação conjunta entre o MAC e o inflamassoma NLRP3 (proteína 3 estruturalmente composta pelo domínio pirina, domínio com repetições ricas em leucina (LRR) e domínio NACHT) para a síntese e liberação de IL-1β por células dendríticas estimuladas por LPS foi recentemente proposta. Na ausência do MAC, embora haja produção de pró-IL-1β, não ocorre a ativação da caspase-1, impedindo a maturação e liberação desta citocina (Laudisi et al., 2013).

1.3 Importância do Sistema Complemento na leptospirose

Estudos recentes desenvolvidos por nosso grupo têm demonstrado diferentes estratégias utilizadas *in vitro* por leptospiras patogênicas para escaparem da atividade do Sistema Complemento e, dessa forma, conseguirem se fixar no organismo (Barbosa et al., 2009; Castiblanco-Valencia et al., 2012). Contudo, pouco é conhecido sobre a participação do Sistema Complemento na infecção por leptospiras em modelos *in vivo*.

Assim como bactérias de outras espécies, as leptospiras patogênicas são capazes de se ligar aos reguladores do Sistema Complemento. Estudos iniciais mostraram a capacidade de diferentes sorovares de leptospiras se ligarem aos reguladores FH e C4BP (Barbosa et al., 2009; Castiblanco-Valencia et al., 2012; Meri et al., 2005; Silva et al., 2011).

Trabalhos *in vitro* ainda mostraram que, quando comparada à *L. biflexa* e à *L. interrogans* sorovar Pomona (atenuada pelas várias passagens em meio de cultura e por isso possui menor patogenicidade), bactérias patogênicas como a *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (LPF) ligam menores quantidades de diversas proteínas do Sistema Complemento, entre elas C5, em sua superfície, quando incubadas com soro (Barbosa et al., 2009).

Por meio da proteína LcpA, ausente na *L. biflexa* (não patogênica), a LPF interage com C4BP, um importante regulador da Via Clássica e das lectinas que acelera o decaimento da C3 convertase dessas vias e atua como cofator do FI para a clivagem de C4b em C4c e C4d (Barbosa et al., 2010). C4BP e Fator H (FH) interagem com as proteínas LigA e LigB, ambas presentes na LPF e ausentes na *L. biflexa*. Uma vez que essa interação ocorre, essas proteínas mantêm sua atividade regulatória, com C4BP atuando na clivagem de C4b e o FH na clivagem de C3b, ambos como co-fatores de FI (Castiblanco-Valencia et al., 2012).

Além da interação com proteínas reguladoras, leptospiras patogênicas secretam enzimas capazes de clivar diferentes componentes do Sistema Complemento, como C3 e seus fragmentos C3b e iC3b, C2, C4 e FB, diminuindo a atividade das três vias de ativação do Sistema Complemento (Fraga et al., 2014).

Essa capacidade da LPF em se ligar a diferentes reguladores do Sistema Complemento de forma que eles permaneçam ativos e clivem seus respectivos substratos, além da clivagem de diferentes proteínas, como C3 e seus fragmentos gerados após a ativação do sistema, através da secreção de enzimas, reduzindo a deposição de proteínas do Sistema Complemento permite explicar a maior sobrevivência da LPF à lise mediada pelo Sistema Complemento em relação a *L. biflexa* (Barbosa et al., 2009), que não possui os mesmos mecanismos de escape da resposta imune do hospedeiro.

Apesar de haver estudos experimentais que empregam modelos *in vivo* de infecção com leptospiras, há escassez de trabalhos que demonstrem a real importância do Sistema Complemento na leptospirose. A utilização de modelos murinos que empreguem deficiência de C5 e, devido a esta característica tenham alterações desde a quimiotaxia de leucócitos para locais de ativação do Sistema Complemento até mesmo uma potencial menor atividade dessas células, pode contribuir com informações relevantes sobre a ação desse sistema na infecção e sobre a própria importância da funcionalidade do Sistema Complemento na capacidade do organismo reagir a um estímulo agressor e controlar o grau de lesão que pode ser gerado nesse processo.

Com o objetivo de entender melhor a importância *in vivo* do Sistema Complemento para o controle da infecção por leptospiras, propusemos o emprego de linhagens murinas que possuam as três vias funcionais (C57Bl/6 – ou B6) ou que tenham falhas devido à ausência de C5 (A/J). Considerando que essas linhagens além da presença ou ausência de C5 têm diferente fundo genético, utilizamos também linhagens congênicas, A.B6-Hc (A/J $C5^{+/+}$ - $C5^{+}$) e B6.A-Hc^{0} (B6 $C5^{-/-}$ - $C5^{-}$), ambas desenvolvidas em nosso laboratório (Bavia et al., 2014), para delimitar qual é o papel real dessa proteína, no controle efetivo desta infecção.

6 CONCLUSÕES

O protocolo utilizado para preparar os inóculos contendo LPF mantém a capacidade dessas bactérias em causar sintomas clínicos da doença nos hamsters, animais susceptíveis à infecção, e alterações fisiológicas nas quatro linhagens de camundongos utilizadas nesse projeto.

O acompanhamento dos camundongos por seis dias permitiu uma melhor observação das variações entre os animais infectados daqueles inoculados com PBS, sendo por isso escolhido para o experimento com os congênicos ao invés do modelo de três semanas de infecção.

A infecção com 1,5 x 10^8 LPF mostrou diferenças relacionadas aos fundos genéticos A/J e B6, à presença ou ausência de C5 e a ambos. Os parâmetros que sofreram maior influência de C5 foram:

1. Linfócitos T $CD4^+$: camundongos B6 $C5^-$ possuem menor porcentagem dessas células na circulação periférica que camundongos B6 $C5^+$;
2. Linfócitos T $CD8^+$: camundongos $C5^-$ possuem menor porcentagem dessas células na circulação periférica que camundongos $C5^+$, independente do fundo genético;
3. Linfócitos T $CD8^+$ ativados: a redução da porcentagem dessas células na circulação periférica é mais rápida nos animais $C5^-$;
4. Concentração de citocinas: Camundongos B6 $C5^+$ têm maior concentração de TNF, IL-6, IL-10, IL-12p40 e IL-12p70 no rim que camundongos B6 $C5^-$, enquanto animais A/J $C5^-$ apresentam maiores concentrações de TNF e IL-6 no rim que A/J $C5^+$. Camundongos $C5^-$ também possuem menores níveis IL-1β, IL-10, IL-12p40 e IL-12p70 no fígado no sexto dia de infecção;
5. Lesão hepática: Camundongos B6 $C5^+$ desenvolvem lesões mais intensas no terceiro dia que camundongos B6 $C5^-$, sendo os únicos a apresentar áreas de necrose e células mitóticas no terceiro dia de infecção.

A concentração de leucócitos na circulação periférica permaneceu constante nos camundongos B6, reduzindo no terceiro dia apenas nos camundongos A/J, independentemente de C5. Para nossa surpresa, diminuiu a porcentagem de neutrófilos durante a infecção em A/J e B6, independente de C5, enquanto a porcentagem de monócitos aumentou no terceiro dia de experimento em todas as linhagens. A porcentagem de linfócitos B aumentou apenas nos camundongos B6, permanecendo constante nos camundongos A/J, independente de C5.

O desenvolvimento de esplenomegalia aconteceu independentemente de C5, sendo mais intensa no terceiro dia de infecção nos camundongos B6.

Camundongos A/J, independente de C5, apresentaram elevação da concentração de ALT no soro, enquanto apenas camundongos A/J $C5^+$ tiveram aumento dos níveis séricos de AST. A concentração de ureia no soro estava reduzida no terceiro dia de infecção em todas as linhagens, sendo parcialmente restabelecida no sexto dia. A concentração de ácido úrico aumentou significativamente no sexto dia nos camundongos B6, independentemente de C5.

Somente camundongos A/J apresentaram aumento significativo das concentrações de TNF-α, IFN-γ e IL-6 no soro no terceiro dia de infecção, independente de C5.

O fígado e o baço foram os principais órgãos afetados pela infecção com LPF. Todas as linhagens tiveram indivíduos com aumento do número de células no sinusóides hepáticos e desenvolvimento de infiltrados leucocitários e de células mitóticas, um indicativo de lesão hepatocelular seguida de regeneração tecidual. O baço mostrou uma tendência de ativação da região perifolicular, rica em linfócitos B, com posterior ativação da região centrofolicular, rica em linfócitos T, permanecendo as duas regiões bastante ativas no sexto dia de infecção. A detecção de LPF nesses órgãos foi bastante intensa. Contudo, não foi possível detectar diferenças significativas na quantidade de leptospiras entre camundongos A/J e B6, independente de C5, sendo necessária a realização de reações de RT-PCR para afirmar se há ou não diferença na capacidade das diferentes linhagens de camundongos em eliminar aLPF do organismo.

Todas as linhagens desenvolveram lesões pulmonares durante a infecção. No entanto, da mesma forma que no rim, que não apresentou alterações histopatológicas, não foram detectadas leptospiras no pulmão.

REFERÊNCIAS*

Adler B, Faine S. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with Leptospira interrogans Sorovar Pomona. Infect Immun. 1976;14(3):703-8.

Adler B, Faine, S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. Infect Immun. 1977;17(1):67-72.

Adler B, de la Peña Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. Vet Microbiol. 2010;140(3-4):287-96.

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

Ashman RB, Fulurija A, Papadimitriou JM. Strain-dependent differences in host response to Candida albicans infection in mice are related to organ susceptibility and infectious load. Infect Immun. 1996;64(5):1866-9.

Barbosa AS, Abreu PA, Vasconcellos SA, Morais ZM, Gonçales AP, Silva AS, 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, Cianciarullo AM, et al. 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.

Bavia L, de Castro IA, Massironi SMG, Isaac L. Basal physiological parameters of two congenic mice strains: C5 deficient C57BL/6 and C5 sufficient A/J. Immunol Lett. 2014 May-Jun;159(1-2):47-54.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis. 2003;3(12):757-71.

Bokisch VA, Müller-Eberhard HJ. Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. J Clin Invest. 1970;49(12):2427-36.

Cain SA, Coughlan T, Monk PN. Mapping the ligand-binding site on the C5a receptor: arginine74 of C5a contacts aspartate282 of the C5a receptor. Biochemistry. 2001;40(46):14047-52.

Caspi RR. Th1 and Th2 responses in pathogenesis and regulation of experimental autoimmune uveoretinitis. Int Rev Immunol. 2002 Mar-Jun;21(2-3):197-208.

* De acordo com:
Internatonal Commitee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submited to biomedical journals. [2011 July 15]. Available from:http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB, Monaris D, Abreu PA, Strobel S, et al. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. J Infect Dis. 2012;205(6):995-1004.

Chagas-Junior AD, McBride AJ, Athanazio DA, Figueira CP, Medeiros MA, Reis MG, et al. An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. J Med Microbiol. 2009;58(Pt 12):1632-7.

Chassin C, Picardeau M, Goujon JM, Bourhy P, Quellard N, Darche S, et al. TLR4- and TLR2-Mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, Leptospira interrogans. J Immunol. 2009;183(4):2669-77.

Chen NJ, Mirtsos C, Suh D, Lu YC, Lin WJ, McKerlie C, et al. C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. Nature. 2007 Mar 8;446(7132):203-7.

Clark JD, Qiao Y, Li X, Shi X, Angst MS, Yeomans DC. Blockade of the complement C5a receptor reduces incisional allodynia, edema, and cytokine expression. Anesthesiology. 2006;104(6):1274-82.

Craig SB. Host Responses to Leptospiral Infections [Ph. D. thesis]. Queensland: University of the Sunshine Coast; 2010.

da Silva JB, Ramos TM, de Franco M, Paiva D, Ho PL, Martins EA, et al. Chemokines expression during Leptospira interrogans sorovar Copenhageni infection in resistant BALB/C and susceptible C3H/HeJ mice. Microb Pathog. 2009;47(2):87-93.

da Silva JB1, Carvalho E, Covarrubias AE, Ching AT, Mattaraia VG, Paiva D, 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.

D'Eustachio P, Kristensen T, Wetsel RA, Riblet R, Taylor BA, Tack BF. Chromosomal location of the genes encoding complement components C5 and factor H in the mouse. J Immunol. 1986;137(12):3990-5

Dobrina A, Pausa M, Fischetti F, Bulla R, Vecile E, Ferrero E, et al. Cytolytically inactive terminal complement complex causes transendothelial migration of polymorphonuclear leukocytes in vitro and in vivo. Blood. 2002;99(1):185-92.

Eglite S, Plüss K, Dahinden CA. Requirements for C5a receptor-mediated IL-4 and IL-13 production and leukotriene C4 generation in human basophils. J Immunol. 2000;165(4):2183-9.

el-Lati SG, Dahinden CA, Church MK. Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. J Invest Dermatol. 1994;102(5):803-6.

Erdogan HM, Karapehlivan M, Citil M, Atakisi O, Uzlu E, Unver A. Serum sialic acid and oxidative stress parameters changes in cattle with leptospirosis. Vet Res Commun. 2008;32(4):333-9.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. Leptospira and leptospirosis. 2nd. ed. Melbourne: MediSci; 1999. 296 p.

Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Day DE, Zetoune FS, Sarma JV, Huber-Lang MS, Ward PA. Functions of the complement components C3 and C5 during sepsis. FASEB J. 2008;22(10):3483-90.

Foey AD, Parry SL, Williams LM, Feldmann M, Foxwell BM, Brennan FM. Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. J Immunol. 1998;160(2):920-8.

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

Fraga TR, Courrol DD, Castiblanco-Valencia MM, Hirata IY, Vasconcellos SA, Juliano L, et al. Immune evasion by pathogenic leptospira strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. J Infect Dis. 2014;209(6):876-86.

Freire IMA, Varges R, Lilenbaum W. Blood urea nitrogen and creatinine levels in dogs with acute leptospirosis determined by Icterohaemorrhagiae serogroup. Cienc Rural. 2008;38(4):1172-5

Gao H, Neff TA, Guo RF, Speyer CL, Sarma JV, Tomlins S, et al. Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. FASEB J. 2005 Jun;19(8):1003-5.

Gerard NP, Lu B, Liu P, Craig S, Fujiwara Y, Okinaga S, et al. An anti-inflammatory function for the complement anaphylatoxin C5a-binding protein, C5L2. J Biol Chem. 2005 Dec 2;280(48):39677-80.

Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvão Reis M, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. Infect Immun. 2001;69(8):4958-68.

Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. Annu Rev Immunol. 2005;23:821-52.

Hamza T, Barnett JB, Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. Int J Mol Sci. 2010;11(3):789-806.

Haviland DL, Haviland JC, Fleischer DT, Wetsel RA. Structure of the murine fifth complement component (C5) gene. A large, highly interrupted gene with a variant donor splice site and organizational homology with the third and fourth complement component genes. J Biol Chem. 1991;266(18):11818-25.

Hoser GA, Skirecki T, Złotorowicz M, Zielińska-Borkowska U, Kawiak J. Absolute counts of peripheral blood leukocyte subpopulations in intraabdominal sepse and pneumonia-derived sepse: a pilot study. Folia Histochem Cytobiol. 2012;50(3):420-6.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepse. N Engl J Med. 2003;348(2):138-50.

Hu W, Ge Y, Ojcius DM, Sun D, Dong H, Yang XF, et al. p53 signalling controls cell cycle arrest and caspase-independent apoptosis in macrophages infected with pathogenic Leptospira species. Cell Microbiol. 2013;15(10):1642-59.

Inada R, Ido Y. Preliminary report on the identification of a causative spirochete (a new species) of Weil's disease (in Japanese). Fukuoka Ikadaigaku Zasshi (Fukuoka acta med.) 1915;8:368–9.

Kim AH, Dimitriou ID, Holland MC, Mastellos D, Mueller YM, Altman JD, et al. Complement C5a receptor is essential for the optimal generation of antiviral CD8+ T cell responses. J Immunol. 2004;173(4):2524-9.

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

Kobayashi Y. Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. J Infect Chemother. 2001;7(1):10-5.

Lajoie S, Lewkowich IP, Suzuki Y, Clark JR, Sproles AA, Dienger K, Budelsky AL, Wills-Karp M. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. Nat Immunol. 2010;11(10):928-35.

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

Lau C, Smythe L, Weinstein P. Leptospirosis: an emerging disease in travellers. Travel Med Infect Dis. 2010;8(1):33-9.

Lasek W, Zagożdżon R, Jakobisiak M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? Cancer Immunol Immunother. 2014;63(5):419-35.

Laudisi F, Spreafico R, Evrard M, Hughes TR, Mandriani B, Kandasamy M, et al. Cutting edge: the NLRP3 inflammasome links complement-mediated inflammation and IL-1β release. J Immunol. 2013;191(3):1006-10.

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

Liu T, Xu G, Guo B, Fu Y, Qiu Y, Ding Y, et al. An essential role for C5aR signaling in the optimal induction of a malaria-specific CD4+ T cell response by a whole-killed blood-stage vaccine. J Immunol. 2013;191(1):178-86.

Lorenzo-Morales J. Zoonosis. Rijeka: InTech; 2012. 436 p.

Manthey HD, Woodruff TM, Taylor SM, Monk PN. Complement component 5a (C5a). Int J Biochem Cell Biol. 2009;41(11):2114-7.

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(5):3325-31.
Marinho M, Oliveira-Júnior IS, Monteiro CM, Perri SH, Salomão R. Pulmonary disease in hamsters infected with Leptospira interrogans: histopathologic findings and cytokine mRNA expressions. Am J Trop Med Hyg. 2009;80(5):832-6.

Markiewski MM, DeAngelis RA, Strey CW, Foukas PG, Gerard C, Gerard N, et al. The regulation of liver cell survival by complement. J Immunol. 2009 May 1;182(9):5412-8.

Marotto PC, Nascimento CM, Eluf-Neto J, Marotto MS, Andrade L, Sztajnbok J, et al. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. Clin Infect Dis. 1999;29(6):1561-3.

Mashruwala MA, Smith AK, Lindsey DR, Moczygemba M, Wetsel RA, Klein JR, et al. A defect in the synthesis of Interferon-γ by the T cells of Complement-C5 deficient mice leads to enhanced susceptibility for tuberculosis. Tuberculosis. 2011;91 Suppl 1:S82-9.

Mastellos D, Papadimitriou JC, Franchini S, Tsonis PA, Lambris JD. A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. J Immunol. 2001 Feb 15;166(4):2479-86.
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(4):139-47.

Merien F, Baranton G, Perolat P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic Leptospira interrogans are correlated with virulence. Infect Immun. 1997;65(2):729-38.

Merien F, Truccolo J, Rougier Y, Baranton G, Perolat P. In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae. FEMS Microbiol Lett. 1998;169(1):95-102.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. J Immunol. 2000 Jun 15;164(12):6166-73.

Mollnes TE, Brekke OL, Fung M, Fure H, Christiansen D, Bergseth G, et al. Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. Blood. 2002;100(5):1869-77.

Monk PN, Scola AM, Madala P, Fairlie DP. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. Br J Pharmacol. 2007;152(4):429-48.

Morley BJ, Walport MJ. The complement factsbook. London: Academic Press; 2000. 240 p.

Moulton RA, Mashruwala MA, Smith AK, Lindsey DR, Wetsel RA, Haviland DL, et al. Complement C5a anaphylatoxin is an innate determinant of dendritic cell-induced Th1 immunity to Mycobacterium bovis BCG infection in mice. J Leukoc Biol. 2007;82(4):956-67.

Mullick A, Tremblay J, Leon Z, Gros P. A novel role for the fifth component of complement (C5) in cardiac physiology. PLoS One. 2011;6(8):e22919.

Nahori MA, Fournié-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M, Raetz CR, et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. J Immunol. 2005 Nov 1;175(9):6022-31.

Nataf S, Davoust N, Ames RS, Barnum SR. Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. J Immunol. 1999;162(7):4018-23.

Nally JE, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA. Lethal infection of C3H/HeJ and C3H/SCID mice with an isolate of Leptospira interrogans serovar copenhageni. Infect Immun. 2005;73(10):7014-7.

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

Organização Mundial da Saúde. Leptospirosis worldwide. Wkly Epidemiol Rec. 1999;74(29):237-42.

Patel SN, Berghout J, Lovegrove FE, Ayi K, Conroy A, Serghides L, et al. C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria. J Exp Med. 2008;205(5):1133-43.

Pereira MM, Andrade J, Marchevsky RS, Ribeiro dos Santos R. 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.

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

Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, et al. Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region Blood Cells Mol Dis. 1998;24(3):340-55.

Pritchard MT, McMullen MR, Stavitsky AB, Cohen JI, Lin F, Medof ME, et al. Differential contributions of C3, C5, and decay-accelerating factor to ethanol-induced fatty liver in mice. Gastroenterology. 2007 Mar;132(3):1117-26.

Que-Gewirth NL, Ribeiro AA, Kalb SR, Cotter RJ, Bulach DM, Adler B, et al. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in leptospira interrogans lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. J Biol Chem. 2004;279(24):25420-9.

Santos CS, Macedo JO, Bandeira M, Chagas-Junior AD, McBride AJ, McBride FW, et al. Different outcomes of experimental leptospiral infection in mouse strains with distinct genotypes. J Med Microbiol. 2010;59(Pt 9):1101-6.

Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalofonos I, et al. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. Am J Trop Med Hyg. 2002;66(5):605-10.

Scola AM, Higginbottom A, Partridge LJ, Reid RC, Woodruff T, Taylor SM, et al. The role of the N-terminal domain of the complement fragment receptor C5L2 in ligand binding. J Biol Chem. 2007;282(6):3664-71.

Selleri C, Sato T, Anderson S, Young NS, Maciejewski JP. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha suppress both early and late stages of hematopoiesis and induce programmed cell death. J Cell Physiol. 1995;165(3):538-46.

Shah I, Katira B. Clinical and laboratory profile of dengue, leptospirosis and malaria in children: a study from Mumbai. Arch Dis Child. 2007;92(6):561.

Silva AS, Valencia MM, Cianciarullo AM, Vasconcellos SA, Barbosa AS, Isaac L. Interaction of human complement factor H variants Tyr^{402} and His^{402} with Leptospira spp. Front Immunol. 2011;2:1-8.

Snyderman R, Phillips JK, Mergenhagen SE. Biological activity of complement in vivo. Role of C5 in the accumulation of polymorphonuclear leukocytes in inflammatory exudates. J Exp Med. 1971;134(5):1131-43.

Stefos A, Georgiadou SP, Gioti C, Loukopoulos A, Ioannou M, Pournaras S, et al. Leptospirosis and pancytopenia: two case reports and review of the literature. J Infect. 2005;51(5):e277-80.

Strainic MG1, Liu J, Huang D, An F, Lalli PN, Muqim N, et al. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive $CD4^+$ T cells. Immunity. 2008;28(3):425-35.

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

Tajiki H, Salomão R. Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. Clin Infect Dis. 1996;23(5):1177-8.

Thorley JD, Smith JW, Luby JP, Sanford JP. Peripheral blood lymphocyte response to acute infections in humans. Infect Immun. 1977;16(1):110-4.

Vernel-Pauillac F, Goarant C. Differential cytokine gene expression according to outcome in a hamster model of leptospirosis. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(1):e582.

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.

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

Ward PA, Zvaifler NJ. Complement-derived leukotactic factors in inflammatory synovial fluids of humans. J Clin Invest. 1971;50(3):606-16.

Weil A. Ueber eine eigentümliche, mit milztumor, icterus und nephritis einhergehende akute infektionskrankheit. Dtsche. Arch. Klin. Med. 1886;39:209-32.

Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. Nat Immunol. 2001;2(4):346-52.

Wetsel RA, Fleischer DT, Haviland DL. Deficiency of the murine fifth complement component (C5). A 2-base pair gene deletion in a 5'-exon. J Biol Chem. 1990;265(5):2435-40.

Whitney MA, Royle G, Low MJ, Kelly MA, Axthelm MK, Reifsteck C, et al. Germ cell defects and hematopoietic hypersensitivity to gamma-interferon in mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia C gene. Blood. 1996;88(1):49-58.

Xu DZ, Zaets SB, Chen R, Lu Q, Rajan H, Yang X, et al. Elimination of C5aR prevents intestinal mucosal damage and attenuates neutrophil infiltration in local and remote organs. Shock. 2009;31(5):493-9.

Xue F, Zhao X, Yang Y, Zhao J, Yang Y, Cao Y, et al. Responses of murine and human macrophages to leptospiral infection: a study using comparative array analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(10):e2477.

Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. Nat Rev Immunol. 2009;9(10):729-40.